

LATVIJAS UNIVERSITĀTE



ĻAISANA ŠAKIROVA

**KULTIVĀCIJAS APSTĀKĻU IETEKME UZ
ETANOLVEIDOJOŠO UN PIENSKĀBES BAKTĒRIJU
VIRSMAS ĪPAŠĪBĀM UN FIZIOLOĢISKO NOTURĪBU**

**INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS
ON THE CELL SURFACE PROPERTIES AND PHYSIOLOGICAL
RESISTANCE OF ETHANOLOGENIC
AND LACTIC ACID BACTERIA**

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

Doktora grāda iegūšanai bioloģijas nozarē

Apakšnozare: mikrobioloģija

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

Submitted for the degree of Doctor of biology

Subfield of microbiology

Rīga, 2013

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE

ĻAISANA ŠAKIROVA

**KULTIVĀCIJAS APSTĀKĻU IETEKME UZ
ETANOLVEIDOJOŠO UN PIENSKĀBES BAKTĒRIJU
VIRSMAS ĪPAŠĪBĀM UN FIZIOLOĢISKO NOTURĪBU**

Promocijas darba kopsavilkums

Doktora grāda iegūšanai bioloģijas nozarē
Apakšnozare: mikrobioloģija

Rīga, 2013

Promocijas darbs izstrādāts:

Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā
laika posmā no 2008. gada līdz 2012. gadam.



LATVIJAS
UNIVERSITĀTE
ANNO 1919

Eiropas Sociālā fonda projekts „Atbalsts doktora studijām Latvijas
Universitātē” Nr.2009/0138/ 1DP/1.1.2.1.2./ 09/IPIA/ VIAA/004.

Darbs sastāv no ievada, literatūras apskata, materiālu un metožu, rezultātu un diskusijas nodaļām, secinājumiem, aizstāvēšanai izvirzītām tēzēm un literatūras saraksta.

Darba forma: publikāciju kopa bioloģijas nozarē, mikrobioloģijas apakšnozarē

Darba zinātniskais vadītājs/-a : Pēteris Zikmanis, *Dr. habil. biol.*, vadošais pētnieks (LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūts, Rīga, Latvija;
Māra Grūbe, *Dr. biol.*, vadošais pētnieks (LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūts, Rīga, Latvija.

Darba recenzenti:

- 1) Prof., *Dr. habil. biol.* Indriķis Muižnieks (Latvijas Universitāte Bioloģijas fakultāte);
- 2) *Dr. habil. biol.* Aleksandrs Rapoportš (LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūts);
- 3) *Dr. habil. phys.* Larisa Grigorjeva (LU Cietvielu fizikas institūts).

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2013. gada 10. maijā, pulkst. 15.30, Kronvalda bulvārī 4, Latvijas Universitātes Bioloģijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Kalpaka bulvārī 4.

LU bioloģijas zinātņu nozares promocijas

padomes priekšsēdētājs /- a

_____/ Uldis Kalnenieks/
(paraksts)

promocijas padomes sekretārs/- e

_____/ Daina Eze/
(paraksts)

© Latvijas Universitāte, 2013
© *Ļaisana Šakirova*, 2013

ANOTĀCIJA

Mijiedarbība ar ārējo vidi ir nozīmīgākais faktors mikroorganismu dzīves cikla (šūnu dalīšanās, augšana, attīstība) stadijās. Šūnu virsmas īpašības lielā mērā nosaka šīs mijiedarbības (vielmiņas produktu apmaiņa, noturība pret ārējiem stresiem, ko izraisa mehāniskie, ķīmiskie, termiskie un osmotiskie faktori) raksturu. Virsmas īpašības būtiski ietekmē arī mikroorganismu savstarpējo mijiedarbību un attiecības ar saimniekorganismiem.

Baktēriju šūnu virsmas galvenie raksturlielumi ir šūnu virsmas hidrofbītāte (ŠVH), ko nosaka šūnapvalka hidrofobo un hidrofilo komponentu attiecības, šūnu elektriskās īpašības (lādiņš) un baktēriju šūnu virsmas strukturālā organizācija. Ārvides parametru izmaiņas (kultivācijas apstākļi, dažādu aģentu klātbūtne utt.) izsauc daudzveidīgas atbildes reakcijas, kas izpaužas šūnu virsmas īpašību izmaiņās, ko, savukārt, var kontrolēt atbilstoši mainot vides apstākļus.

Promocijas darbā salīdzinoši izvērtēta dažādu kultivācijas apstākļu kompleksa iedarbība uz etanolveidojošo baktēriju *Zymomonas mobilis* 113S un probiotisko baktēriju *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb12 augšanu un noturību nelabvēlīgos ārvides apstākļos, to saistot ar fizioloģiski un tehnoloģiski nozīmīgām šūnu virsmas īpašībām, īpaši, probiotisko baktēriju tīrkultūrās, šim nolūkam izmantojot faktoreksperimentu plānošanas un daudzparametru analīzes metodes. Darba gaitā novērtēta arī olbaltumvielu sekrēcija baktērijās ar atšķirīgu ŠVH un veikta etanolveidojošo un probiotisko baktēriju šūnapvalka ķīmiskā sastāva izvērtēšana ar Furjē transformācijas infrasarkanās spektroskopijas (FT-IS) un analītiskās ķīmijas metodēm.

Etanolveidojošo baktēriju *Z. mobilis* 113S un probiotisko baktēriju *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 virsmas īpašību izmaiņu virziena un rakstura novērtējums dod iespēju kontrolēt, prognozēt un virzīti ietekmēt tīrkultūru un probiotisko baktēriju ieraugu augšanu, attīstību un šūnu noturību.

Promocijas darba rezultāti apkopoti un publicēti sešās zinātniskajās publikācijās (2005. – 2012. g.) nozares starptautiski recenzējamās žurnālos. Par promocijas darba rezultātiem ir ziņots sešās starptautiskajās zinātniskajās konferencēs. Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā (LU MBI).

SATURS

Anotācija	4
Saturs.....	5
Saīsinājumi.....	6
Pētījuma aktualitāte un vispārējais raksturojums.....	7
Zinātniskā darba aprobācija	9
Baktēriju šūnapvalki un virsmas: struktūras pazīmes un funkcionālās īpašības.....	11
Materiāli un metodes.....	15
Rezultātu pārskats	18
Diskusija.....	29
Secinājumi.....	33
Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes.....	34
Literatūra/References	69

SAĪSINĀJUMI

PB – pienskābes baktērijas
ŠVH – šūnu virsmas hidrofbitāte
LPS – lipopolisaharīdi
KZT – kuņģa-zarnu trakts
FT-IS – Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija
FOS – fruktooligosaharīdi
KDO – ketodioksiglikonskābe
KVV – kolonijas veidojošās vienības
S.K. – standartklūda
n.n. – nav noteikts
a.s.b. – absolūtā sausa biomasa
EPS – eksopolisaharīdi
MRS – *Lactobacillus* barotne pēc De Man, Rogosa un Sharpe (De Man et al., 1960)
MATH – mikroorganismu adhēzija ogļūdeņražiem (Microbial Adhesion To Hydrocarbon)
SAT – šūnu agregācijas tests (Salt Aggregation Test)
PNA – 1-*N*-Fenilnaftilamīns
N.V. – nosacītās vienības

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE UN VISPĀRĒJAIS RAKSTUROJUMS

Mikroorganismu dzīves cikla (šūnu dalīšanās, augšana, attīstība) norisēs izšķiroša ir mijiedarbība ar ārējo vidi. Šīs mijiedarbības (vielmiņas produktu apmaiņa, noturība pret nelabvēlīgiem mehāniskiem, ķīmiskiem, termiskiem un osmotiskiem faktoriem) raksturu lielā mērā nosaka šūnu virsmas īpašības (Schar-Zammaretti & Ubbink, 2003). Virsmas īpašības būtiski ietekmē arī mikroorganismu savstarpējo mijiedarbību un attiecības ar saimniekorganismiem. Baktēriju šūnu virsmas galvenie raksturlielumi ir šūnu virsmas hidrofbotāte (ŠVH), ko nosaka šūnapvalka hidrofboto un hidrofilo komponentu attiecības, šūnu elektriskās īpašības (lādiņš) un baktēriju šūnu virsmas strukturālā organizācija (Geertsema-Doornbusch *et al.*, 1993). Gram-pozitīvajām baktērijām noteicošā loma šūnu virsmas īpašībās ir ekstracelulāriem ar virsmu saistītiem polisaharīdiem un virsmas proteīniem (S-proteīni) (Delcour *et al.*, 1999). Savukārt ir zināms, ka proteobaktēriju *Z. mobilis* hidrofilajā šūnu virsmā dominē lipopolisaharīdi (LPS), bet hidrofbotajā virsmā, palielinoties ŠVH, līdztekus palielinās hidrofboto virsmas proteīnu daudzums (Shakirova *et al.*, 2008). Joprojām lielā mērā atklāti paliek jautājumi par šūnapvalka strukturālās organizācijas, virsmas sastāvdaļu ķīmisko īpašību un virsmas makromolekulu konformācijas saistību ar šūnu virsmas fizikāli-ķīmiskajām īpašībām.

Darbam izvēlētie modeļorganismi ir etanolu un citus tehnoloģiski nozīmīgus blakusproduktus (levāns, fruktozes oligosaharīdi, sorbitols u. c.) veidojošās baktērijas *Zymomonas mobilis* 113S un pienskābes baktēriju (PB) tīrkultūras (*Lactobacillus acidophilus* La5 un *Bifidobacterium lactis* Bb12), kas ietilpst jogurtu veidojošo un ATB tipa ieraugu sastāvā un sintezē fruktānus saturošos eksopolisaharīdus (EPS).

Daudzām PB kultūrām ir raksturīgas probiotiskās īpašības, jo tās uzlabo cilvēka veselību, veidojot apstākļus patogēno mikroorganismu izvadīšanai no kuņģa-zarnu trakta (KZT), un stiprina organismu imūnsistēmu (Guarner & Schaafsma, 1998; Ouwehand *et al.*, 2002; Tannock, 2002). Savukārt probiotisko kultūru attīstību sekmē nesagremojamie ogļhidrāti (prebiotiki), tostarp arī *Z. mobilis* sintezētie fruktooligosaharīdi (FOS) un levāns (Semjonovs *et al.*, 2008). Galvenais un izšķirošais kritērijs, lai PB sekmīgi izpildītu savus uzdevumus, ir noturība pret kuņģa sulas sāļsskābi, žults skābēm un gremošanas fermentiem, lai pietiekamā skaitā un dzīvotspējīgā stāvoklī sasniegtu un noturētos (piesaistītos pie epitēlija šūnām) KZT (Ouwehand *et al.*, 2002). Turklāt probiotiķiem jāizdzīvo arī tehnoloģiskajos procesos (saldēšana, liofilizācija u. c.) un gatavā produkta uzglabāšanas laikā (van de Guchte *et al.*, 2002). Probiotiku dzīvotspēja pārtikas produktos var būt atkarīga no pH, uzglabāšanas temperatūras, skābekļa līmeņa, konkurējošo mikroorganismu un inhibitoru klātbūtnes (Carvalho *et al.*, 2004).

Ārvides parametru izmaiņas izsauc daudzveidīgas atbildes reakcijas, kas izpaužas šūnu virsmas īpašību izmaiņās (Schar-Zammaretti & Ubbink, 2003). Esam noskaidrojuši, ka *Z. mobilis* ŠVH var ietekmēt, mainot šūnu audzēšanas apstākļus: paaugstinot vai pazeminot audzēšanas temperatūru, mainot oglekļa avotu un tā koncentrācijas, pievienojot eksogēnus membranotropos savienojumus (Zikmanis *et al.*, 2007). Šādi aģenti (deterģenti, augstākie spirti u. c.) ietekmē membrānu funkcijas un to iedarbība ir vērsta uz šūnas hidrofbotajām daļām (Zikmanis *et al.*, 2005). Promocijas darba rezultāti apstiprina, ka *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 ŠVH ir iespējams modulēt, mainot audzēšanas apstākļus (oglekļa avots un tā koncentrācija, audzēšanas fāze, skābekļa klātbūtne), bet to iedarbība atšķiras, salīdzinot ar baktērijām *Z. mobilis*. Esam noteikuši, ka fruktāna polimērs levāns var sekmēt gan ŠVH palielināšanos, gan arī PB augšanu (Shakirova *et al.*, 2013). Darba gaitā esam noskaidrojuši, ka no ŠVH ir atkarīga gan *Z. mobilis* (Shakirova *et al.*, 2008), gan arī *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 (Shakirova *et al.*, 2013) šūnu dzīvotspēja sasaldēšanas/atkausēšanas un liofilizācijas/rehidratācijas procesos. Šajos pētījumos iezīmējās iespējamās aizsargvides (sorbitols, trehaloze) iedarbības rakstura atšķirības baktēriju liofilizācijas laikā un ir pamats uzskatīt, ka aizsargvides var atšķirīgi iedarboties uz hidrofilām un hidrofbotām šūnām.

Literatūrā ir norādes par iespējamu tiešu sakarību starp PB (*Bifidobacterium spp.*) ŠVH un kultūru pH-noturību (Heller, 2001). Mūsu pētījumos, atsevišķu kultūru ietvaros, nonācām pie pretējiem secinājumiem, jo novērtējot *L. acidophilus* La5 pH noturību šūnām ar atšķirīgu ŠVH, nosacīti hidrofilās šūnas izrādījās pH-noturīgākas, tāpat arī kopumā hidrofbotāko *B. lactis* Bb12 gadījumā (Shakirova *et al.*, 2013).

Neskatoties uz to, ka literatūrā ir pētījumi par PB noturību pret stresa faktoriem, ārvīdes ietekmi uz virsmas īpašībām, arī to izpaušmēm probiotiskās efektivitātes nodrošināšanai un ir atzīts, ka šie procesi ir atkarīgi no daudziem faktoriem (Gobetti *et al.*, 2000; Vinderola *et al.*, 2002), joprojām nepietiekami ir pētīti šo faktoru vienlaicīgas mijiedarbības efekti. To skaidrošanai nepieciešamas faktoreksperimentu plānošanas un daudzparametru analīzes metodes, kas veido promocijas darba metodoloģisko pamatu.

Tādēļ promocijas **darba mērķis** ir salīdzinoši izvērtēt dažādu ārvīdes faktoru kompleksu iedarbību uz fizioloģiski un tehnoloģiski nozīmīgām šūnu virsmas īpašībām etanolveidojošām (*Zymomonas mobilis*) un probiotiskajām (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) baktērijām, izmantojot faktoreksperimentu plānošanas un daudzparametru analīzes metodes.

Darba mērķa sasniegšanai tika izvirzīti šādi **uzdevumi**:

1. Novērtēt kultivāciju apstākļu (oglekļa avoti un to koncentrācijas, temperatūra, augšanas fāze, skābekļa klātbūtne, membranotropo savienojumu klātbūtne) ietekmi uz etanolveidojošo un probiotisko baktēriju virsmas īpašībām.

2. Izvērtēt baktēriju fizioloģisko noturību (dzīvotspēju) nelabvēlīgu ārvīdes faktoru (etanols, minerālskābes, žultsskābes, sasaldēšana/atkausēšana, liofilizācija/rehidratācija, kriokonservācija) iedarbībā, atsevišķi un kombinācijā ar citiem faktoriem.

3. Salīdzinoši novērtēt šūnu barjerfunkciju un hidrolītisko olbaltumvielu sekrēciju baktērijās ar atšķirīgu šūnu virsmas hidrofbitāti.

4. Raksturot baktēriju šūnapvalku bioķīmisko sastāvu (olbaltumvielas, lipīdi, ogļhidrāti) un izvērtēt tā īpatnības (alifātisko ķēžu un olbaltumvielu konformācijas pazīmes, šūnapvalka komponentu esterifikācijas pakāpe u. c.) pēc FT-IS absorbcijas joslu viļņu skaitļa un intensitātes izmaiņām.

Promocijas darba **novitāte un zinātniskais nozīmīgums**.

1. Pirmo reizi vienotā skatījumā ir salīdzinoši novērtēta kultivāciju apstākļu (oglekļa avoti un to koncentrācijas, temperatūra, augšanas fāze, skābekļa klātbūtne, membranotropo savienojumu klātbūtne) ietekme uz etanolveidojošo un probiotisko baktēriju virsmas īpašībām.

2. Savstarpēji salīdzināta baktēriju fizioloģiskā noturība (dzīvotspēja) nelabvēlīgu ārvīdes faktoru (etanols, minerālskābes, žultsskābes, sasaldēšana/atkausēšana, liofilizācija/ rehidratācija, kriokonservācija) iedarbībā, atsevišķi un kombinācijā ar citiem faktoriem.

3. Atrastas jaunas pieejas etanolveidojošo un probiotisko baktēriju virsmas īpašību modifikācijai, kas ļauj paaugstināt šūnu dzīvotspēju nelabvēlīgos ārvīdes apstākļos.

4. Salīdzinoši novērtēta šūnu barjerfunkcija un hidrolītisko olbaltumvielu sekrēcija baktērijās ar atšķirīgu šūnu virsmas hidrofbitāti.

5. Raksturots un salīdzināts Gram-negatīvo un Gram-pozitīvo baktēriju šūnapvalku bioķīmiskais sastāvs un izvērtētas tā īpatnības pēc FT-IS absorbcijas joslu viļņu skaitļa un intensitātes izmaiņām.

6. Izvērtētas FT-IS iespējas baktēriju šūnu un šūnapvalku kvalitatīvai un kvantitatīvai analīzei.

Promocijas darba rezultāti paplašina priekšstatus par etanolveidojošo un pienskābes baktēriju šūnapvalku struktūras/īpašību attiecībām, to saistību ar kompleksām kultivācijas apstākļu izmaiņām un šūnu fizioloģisko noturību nelabvēlīgos ārvīdes apstākļos. Baktēriju virsmas īpašību izmaiņu virziena un rakstura novērtējums dod iespēju kontrolēt, prognozēt, mērķtiecīgi ietekmēt šūnu augšanu, attīstību un fizioloģisko noturību, kas nepieciešama fermentācijas produktu tehnoloģiskās stabilitātes un PB probiotiskā potenciāla nodrošināšanai.

Promocijas darbs ir izstrādāts, izmantojot ESF projekta ESS2009/77 «Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē» **finansējumu** (līgums Nr. 2009/0138/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/004).

ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA

Promocijas darba rezultāti ir ziņoti sešās starptautiskajās zinātniskajās konferencēs Francijā, Vācijā, Itālijā, Slovākijā un Šveicē.

1. Semjonovs P., Shakirova L., Grube M., Auzina L., Zikmanis P., Levan promotes the hydrophobicity and biomass productivity of probiotic bacteria in lactose containing media. – 13th World Congress of Food Science & Technology – FOOD IS LIFE; 2006, Nantes, France, September 17-21st (stenda referāts).
2. Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Grube M., Influence of environmental conditions on hydrophobicity of *Zymomonas mobilis* 113S cells and characteristics of FT-IR spectra, 4th International Conference Shedding Light on disease: Optical Diagnosis for the New Millenium; 2006, Heidelberg, Germany, May 21-24th (stenda referāts).
3. Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Grube M., Relationship between the cell surface hydrophobicity and ethanol tolerance of bacteria *Zymomonas mobilis*, 6th Workshop, FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics; 2007, Robert Koch-Institute, Berlin, Germany, October 25-26th (stenda referāts).
4. Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Gavare M., Grube M., Influence of growth conditions on hydrophobicity of *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cells and characteristics of FT-IR spectra, 13th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules; 2009, Italy, Palermo, August 28th-September 2nd (stenda referāts).
5. Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Gavare M., Grube M., Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of probiotic lactic acid bacteria under adverse environmental conditions, International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics - IPC 2010; 2010, Kosice, Slovakia, June 15-17th (stenda referāts).
6. Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Gavare M., Grube M., Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 bacteria under adverse environmental conditions and characteristics of FT-IR spectra, 4th Congress of the European Microbiologists FEMS 2011; 2011, Geneva, Switzerland, June 26-30th (stenda referāts).

Promocijas darba rezultāti apkopoti un publicēti sešās zinātniskajās publikācijās nozares starptautiski recenzējamos žurnālos.

1. Zikmanis P., Shakirova L., Baltkalne M., Andersone I., Auzina L., The effect of amphiphilic compounds on the secretion of levansucrase by *Zymomonas mobilis*. – Process of Biochemistry, 2005, 40: 3723-3731.
2. Zikmanis P., Shakirova L., Auzina L., Andersone I., Hydrophobic properties of bacteria *Zymomonas mobilis* under varied environmental conditions. – Process of Biochemistry, 2007, 42: 745-750.
3. Shakirova L., Auzina L., Grube M., Zikmanis P., Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of bacteria *Zymomonas mobilis* after exposures to ethanol, freezing or freeze-drying. – Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35: 1175-1180.
4. Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Gavare M., Grube M., Influence of growth conditions on hydrophobicity of *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cells and characteristics of FT-IR spectra. – Spectroscopy, 2010, 24: 251-255; DOI 10.3233/SPE-2010-0470.
5. Shakirova L., Grube M., Goodacre R., Gavare M., Auzina L., Zikmanis P., FT-IR spectroscopic investigation of bacterial cell envelopes from *Zymomonas mobilis* which have different surface hydrophobicities. – Vibrational Spectroscopy, 2013, 64: 51-57; DOI: 10.1016/j.vibspec.2012.10.008

6. Shakirova L., Grube M., Gavare M., Auzina L., Zikmanis P., Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 and characteristics of FT-IR spectra. – Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013; 40: 85-93; DOI: 10.1007/s10295-012-1204-z.

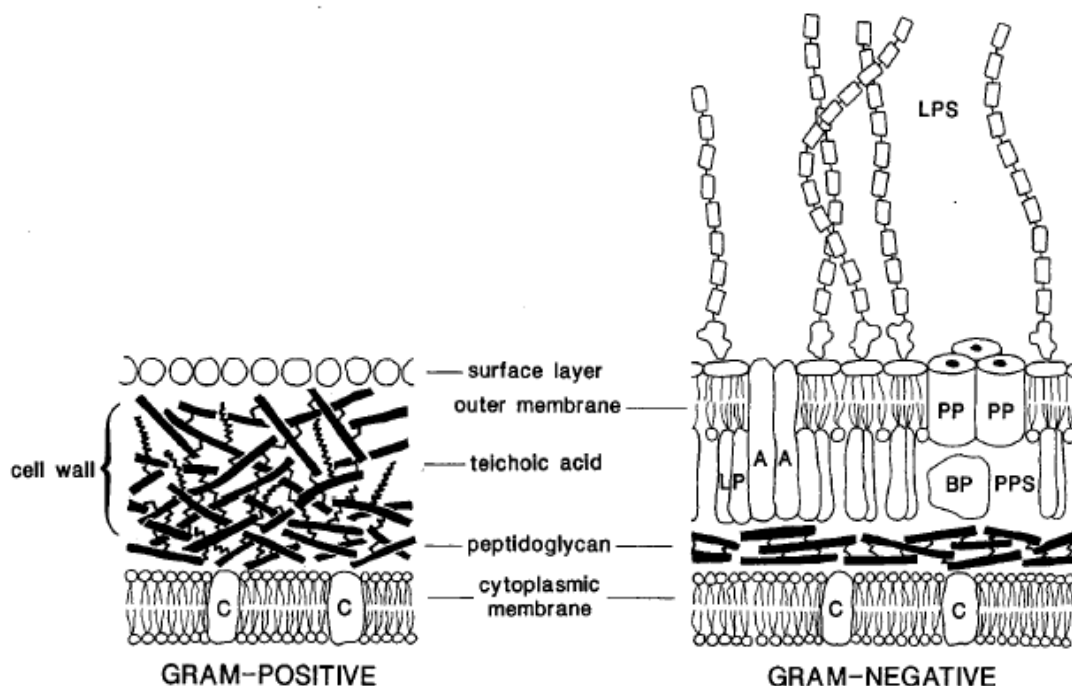
Promocijas darbs ir 2005. – 2012. gados publicēto zinātnisko rakstu kopa. Promocijas darbs ir izstrādāts Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā (LU MBI).

BAKTĒRIJU ŠŪNAPVALKI UN VIRSMAS: STRUKTŪRAS PAZĪMES UN FUNKCIONĀLĀS ĪPAŠĪBAS

Mijiedarbība ar ārējo vidi ir nozīmīgākais faktors mikroorganismu dzīves cikla (šūnu dalīšanās, augšana, attīstība) stadijās. Šūnu virsmas īpašības lielā mērā nosaka šīs mijiedarbības (vielmaiņas produktu apmaiņa, noturība pret ārējiem faktoriem – mehāniskie, ķīmiskie, termiskie un osmotiskie) raksturu (Schar-Zammaretti & Ubbink, 2003). Virsmas īpašības būtiski ietekmē arī mikroorganismu savstarpējo mijiedarbību un to attiecības ar saimniekorganismiem. Izšķir specifiskās un nespecifiskās mikroorganismu mijiedarbības. Par specifisko mijiedarbību pieņemts uzskatīt to komplementāro saišu mijiedarbību, ko veido mikroorganismu šūnu virsma un virsma, uz kuras tās spēj kolonizēties un kam ir augstāka savstarpējāafinitāte (Savage & Fletcher, 1985). Savukārt, nespecifisko mijiedarbību regulē mikroorganismu šūnapvalka vispārējās fizikāli-ķīmiskās īpašības, tostarp elektrostātiskās un hidrofobās mijiedarbības (Sweet *et al.*, 1987).

Priekšstati par to, ka svarīgus mikroorganismu uzvedības aspektus iespējams kontrolēt, izmantojot šūnu virsmas fizikāli-ķīmiskās īpašības, ir veidojušies jau ilgāku laiku (Webster, 1925; Marshall, 1976; Wadström, 1990). Tomēr saistības starp šūnapvalka struktūru un tās fizikāli-ķīmiskajām īpašībām sāka detalizēti sāka pētīt salīdzinoši nesen (Boulbitch *et al.*, 2000; Busscher *et al.*, 2000). Lai raksturotu mikroorganismu šūnu virsmas mijiedarbības, parasti tiek analizētas vispārējās šūnu virsmas elektriskās īpašības, galvenokārt z-potenciāls, arī virsmas hidrofobitāte (Schar-Zammaretti & Ubbink, 2003). Informāciju par šīm divām īpašībām savukārt izmanto, lai modelētu mijiedarbību starp baktērijas šūnapvalku un saimniekorganisma ārējo virsmu. ŠVH ir uzskatāma par fizikāli mērāmu makroskopisku īpašību, kas atspoguļo hidrofilo un hidrofobo komponentu proporciju šūnapvalkā (Geertsema-Doornbusch *et al.*, 1993). ŠVH izmaiņas var uzskatīt par atbildes reakcijām uz dažādiem ārvidas faktoriem un tādējādi ir iesaistītas starpšūnu mijiedarbībā, baktēriju adhēzijā pie cietām virsmām un saimniekorganisma audiem, šūnu rezistencē pret nelabvēlīgiem ārējās vides apstākļiem u. c. (Rosenberg *et al.*, 1980; Rosenberg & Doyle, 1990; Vanhaecke *et al.*, 1990).

Baktēriju šūnapvalka struktūras un īpašību saistības pētīšanai kā modeļsistēmas pārsvarā izmanto Gram-pozitīvos mikroorganismus, jo tiem ir salīdzinoši vienkārša šūnapvalka struktūra (Delcour *et al.*, 1999). Turklāt šie mikroorganismi ir nekustīgi un ir pieejams liels skaits mikrobioloģiski un ģenētiski labi raksturotu celmu. Gram-pozitīvo baktēriju šūnapvalks pārsvarā sastāv no peptidoglikāna slāņa, (lipo) teihoskābēm, (virsmas) olbaltumvielām un polisaharīdiem (1.1. att.) (Delcour *et al.*, 1999). Gram-negatīvās baktērijas atšķiras ar to, ka virs peptidoglikāna slāņa ir lokalizēta ārējā membrāna (1.1. att.) (Sikkema *et al.*, 1995). Olbaltumvielas, kas ietilpst membrānas sastāvā ir iegremdētas dubultslāni, ko veido fosfolipīdu un LPS molekulas. Ārējās membrānas iekšējā daļā atrodas lipoproteīnu kompleksi, kas saista ārējo membrānu ar glikopeptīdu slāni (Madigan *et al.*, 2000). LPS ir svarīga loma Gram-negatīvo baktēriju apvalka caurlaidības regulācijā, nodrošinot relatīvi hidrofilu šūnas virsmu (Nikaido & Vaara, 1985). Ārējā membrāna pietiekami droši aizsargā *E. coli* šūnu no vairuma hidrofobo antibiotiku. Tikai izjaucot ārējās membrānas struktūru, piemēram, iedarbojoties ar ramnolipīdu uz LPS (Al-Tahhan *et al.*, 2000), var paaugstināt membrānas caurlaidību attiecībā pret hidrofobām molekulām un joniem (Lieve, 1974).



1.1. att. Gram - pozitīvo un Gram - negatīvo baktēriju šūnapvalka shematisks attēls: PP - porīns; C - citoplazmatiskajā membrānā “iebūvētā” olbaltumviela; BP – saistītā olbaltumviela; PPS - periplazmatiskā telpa; A - ārējais membrānu lipīds; LP - lipoproteīns (Sikkema *et al.*, 1995).

PB ir taksonomiski atšķirīgu Gram-pozitīvo baktēriju grupa, kas spēj pārveidot fermentējamus ogļhidrātus, galvenokārt pienskābē, līdztekus skābinot kultivācijas vidi. Daudzas PB sugas izsenis izmanto pārtikas rūpniecībā, galvenokārt fermentēto piena produktu (siers, jogurts, krējums, u. c.) ražošanā, un to nozīme ir vispāratzīta visā pasaulē. Pēdējo dekadžu laikā interese par PB būtiski pieaugusi, pateicoties pētījumiem, kas apstiprina daudzu PB sugu probiotiskās īpašības un to būtisko lomu cilvēka un dzīvnieku veselības uzturēšanā (Corveleyn *et al.*, 2012).

Bifidobacterium un *Lactobacillus* ģints mikroorganismi ir uzskatāmi par „klasiskiem” probiotiķiem un tos plaši izmanto kā t. s. funkcionālās pārtikas sastāvdaļas. Probiotiskus pieņemts definēt kā „dzīvus mikroorganismus, kas, pēc to uzņemšanas noteiktā skaitā, pozitīvi ietekmē saimniekorganismu un uzlabo tā veselību” (Guarner & Schaafsma, 1998; Tannock, 2002). Kā veselību veicinoši probiotiķu efekti mināmi patogēnu inhibīcija, pretmutagēna un pretvēža aktivitāte, caurejas profilakse, imūnās atbildes stimulācija, holesterīna līmeņa samazināšana u. c. (Ouwehand *et al.*, 2002). Tomēr probiotiskās īpašības ir katram celmam specifiskas un tāpēc arī atsevišķi pārbaudāmas un novērtējamas (Ljungh & Wadström, 2006).

Lai PB pietiekamā skaitā un dzīvotspējīgā stāvoklī sasniegtu un noturētos (piesaistītos pie epitēlija šūnām) KZT un sekmīgi izpildītu savus uzdevumus, tām jāpārvar bioloģiskās barjeras, tostarp kuņģa sulas sālsskābes, žultsskābju un gremošanas fermentu klātbūtne (Ouwehand *et al.*, 2002), kā arī neoptimālas augšanas temperatūras un augšanu inhibējošu savienojumu (taukskābes un tanīni) klātbūtne, kas veidojas raugu un baktēriju metabolisma laikā (Kumar *et al.*, 2011). Žultsskābju sāļi sintezējas aknās no holesterīna un sekretējas divpadsmitpirkstu zarnā, lai veicinātu tauku uzsūkšanos, un, tā kā šie savienojumi ir toksiski baktērijām, tad KZT mikroorganismiem jābūt rezistentiem pret žultsskābēm, t. i. jāizdzīvo nelabvēlīgos apstākļos (de los Reyes-Gavilan *et al.*, 2005), bet attiecīgie mehānismi joprojām nav izpētīti. Probiotisko baktēriju adaptācija attiecībā uz šiem nelabvēlīgajiem apstākļiem var veicināt mikroorganismu dzīvotspēju KZT.

Daži uzturā pārstāvētie ogļhidrāti nav sagremojami augšējā KZT un probiotiskās baktērijas var tos izmantot kā fermentācijas substrātus. Šie ogļhidrāti, kas definēti kā prebiotīķi, var selektīvi stimulēt probiotiķu augšanu un veicināt to izplatīšanos KZT, tādējādi sekmējot saimniekorganisma veselības uzlabošanu (de los Reyes-Gavilan *et al.*, 2005).

Fruktānu saturošus prebiotiskus, tostarp levānu (β -2,6-polifruktāns) un FOS, sintezē etanologēnās Gram-negatīvās baktērijas *Zymomonas mobilis*. Šīs baktērijas uzrāda ievērojamu

biosintēzes potenciālu attiecībā uz dažādiem metabolītiem (etanols, levāns, fruktooligosaharīdi, sorbitols, glikonskābe) un ir uzskatāmas par perspektīvu kultūru daudzveidīgam tehnoloģiskajam pielietojumam (Montenecourt, 1985; Doelle *et al.*, 1993; Gunasekaran & Chandra Raj, 1999). Turklāt, proteobaktēriju *Z. mobilis* dabisko fermentācijas kapacitāti var uzlabot ar dažādām fizioloģiskām, ģenētiskām un metabolisma inženierijas pieejām, introducējot un ekspresējot citas izcelsmes gēnus, lai paplašinātu substrātu un produktu spektru (Montenecourt, 1985; Doelle *et al.*, 1993; Gunasekaran & Chandra Raj, 1999).

Jebkurai baktēriju kultūrai, kas izvēlēta rūpnieciskām vajadzībām, ir jāizdzīvo arī nelabvēlīgos apstākļos, kas veidojas tehnoloģiskajos procesos (saldēšana, liofilizācija u. c.) un gatavā produkta transportēšanas, un uzglabāšanas laikā (van de Guchte *et al.*, 2002). Probiotiku dzīvotspēja pārtikas produktos var būt atkarīga no pH, uzglabāšanas temperatūras, skābekļa līmeņa, augstām NaCl vai etanola koncentrācijām, konkurējošo mikroorganismu un inhibitoru klātbūtnes (Carvalho *et al.*, 2004). Ražošanas procesā probiotikus var saglabāt un izplatīt šķidrā, žāvētā, sasaldētā vai liofilizētā formā. Lai gan visas šīs procedūras pārtikas rūpniecībā ir vispirms attiecināmas uz ierauga kultūrām, uzsvars arvien vairāk tiek likts uz ilgtermiņa saglabāšanas metodēm, kas veicina augstu šūnu dzīvotspēju un vielmaiņas aktivitāti, jo attiecīgie parametri tiek uzskatīti par nepieciešamiem, īpaši (bio)medicīnisko preparātu iegūšanai (Carvalho *et al.*, 2004; Corveleyn *et al.*, 2012).

Ir zināms, ka daudzveidīgi ārējās vides faktori var būtiski ietekmēt mikroorganismu šūnu virsmas stabilitāti (Das & Kapoor, 2004). Tā piemēram, fizikālie faktori (temperatūra, gaismas, elektriskie lauki, spiediens, vides pH u. c.) izsauc izmaiņas šūnu virsmas un membrānu sastāvā un funkcijās (Denich *et al.*, 2003). Ārēju stimulu rezultātā šūnas var attīstīt ārējā šūnapvalka slāni, kas ir vairāk adaptēts dažādiem specifiskiem apstākļiem un var mainīt šūnu virsmas hidroforās īpašības (Sikkema *et al.*, 1995). Mikroorganismu virsmas īpašības ir arī atkarīgas arī no kultivācijas apstākļiem un barotnes sastāva. Ir ziņots, ka audzēšanas temperatūra būtiski ietekmē *Z. mobilis* membrānu sastāvu, palielinoties temperatūrai, izmainās tauksābes un fosfolipīdu proporcijas membrānā (Benschoter & Ingram, 1986). Ir parādīts, ka kultivējot *Listeria monocytogenes* baktērijas pie dažādām temperatūrām, šūnu piesaiste pie nerūsējošā tērauda, t. i. ŠVH, palielinās, palielinoties kultivēšanas temperatūrai (Briandet *et al.*, 1999). Ir zināms, ka saharoze būtiski palielina *Pseudomonas fluorescens* ŠVH, salīdzinot ar glikozi vai mannozi (McEldowney & Fletcher, 1985). Tomēr joprojām ir nepietiekami noskaidrotas attiecības starp kultivācijas apstākļu izmaiņām un baktēriju virsmas īpašībām, kā arī to ietekmi uz baktēriju savstarpējo mijiedarbību (Schär-Zammaretti *et al.*, 2005).

Šūnu virsmas un membrānas stāvokli var izmainīt ar dažādām ķīmiskām vielām (Nikaido & Varra, 1985). Piemēram, biosurfaktants ramnolipīds, pat mazās koncentrācijās var būtiski ietekmēt ŠVH, izsaucot daļēju LPS atraušanos no ārējās membrānas (Al-Tahhan *et al.*, 2000). Deterģenti, kas pieder pie heterogēno virsmas aktīvo savienojumu klases, var ietekmēt membrānas, izmainot lipīdu un proteīnu mijiedarbību (Sikkema *et al.*, 1995). Organiskie šķīdinātāji var izsaukt lipīdu un olbaltumvielu zudumu šūnu membrānā, membrānu olbaltumvielu funkciju inhibēšanu, kā arī citu vitāli svarīgu funkciju pavājināšanos (Segura *et al.*, 1999).

Spirtu toksiskā iedarbība ir vērsta uz šūnas hidroforajām daļām, visticamāk uz to plazmatiskajām membrānām. Etanola un bioloģisko membrānu mijiedarbības rezultāts ir samazināta membrānu integritāte (Sikkema *et al.*, 1995). Ir pierādīts, ka alifātisko spirtu mijiedarbība uz modeļmembrānām izraisa fāzu pārejas temperatūras nobīdi (Elias *et al.*, 1976), turklāt spirtu toksiskuma līmenis ir tieši proporcionāls to oglekļa atomu ķēdes garumam (Sikkema *et al.*, 1995). Ir noskaidrots, ka arī membranotropie savienojumi (alifātiskie un aromātiskie spirti, prokaīns un deterģenti) var ietekmēt *Z. mobilis* membrānu īpašības (Zikmanis *et al.*, 2005).

Līdztekus tradicionālajām bioķīmiskajām analīzes metodēm informāciju par baktēriju ārējās šūnu virsmas ķīmisko sastāvu un tā izmaiņām var iegūt arī ar Furjē transformācijas infrasarkanās spektroskopijas (FT-IR) metodi. Infrasarkanā spektroskopija ir neinvazīva metode, kas ļauj analizēt informāciju par bioparauga vispārējo ķīmisko sastāvu (Bosch *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006; Pistorius *et al.*, 2009). To izmanto arī bioparaugu raksturošanai un identifikācijai (Naumann, 2002; Huang *et al.*, 2006; Grube *et al.*, 2012), kā arī fermentācijas procesu un produktu monitoringam (Grube *et al.*, 2002; Mazarevica *et al.*, 2004). Ir zināms, ka šūnapvalka daudzkomponentu strukturālā organizācija var atspoguļoties baktēriju virsmas īpašībās, kā arī organisma vispārējā fizioloģiskajā stāvoklī, parādot

dažādu ārvides apstākļu ietekmi uz šūnu regulācijas mehānismiem (Pistorius *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

Šūnapvalka strukturālās organizācijas, virsmas komponentu ķīmisko īpašību, īpaši virsmas makromolekulu konformācijas saistība ar baktēriju šūnapvalku fizikāli-ķīmiskajām īpašībām, joprojām uzskatāma par nepilnīgi atrisinātu jautājumu.

Dziļāka izpratne par baktēriju, t. sk. probiotisko, virsmas īpašības ietekmējošiem faktoriem, var veicināt tādu baktēriju celmu atlasīšanu un īpašību novērtēšanu, kam piemīt vēlams biosintēzes vai probiotiskais potenciāls un tehnoloģiskā stabilitāte.

MATERIĀLI UN METODES

Mikroorganismu kultūras un kultivēšanas apstākļi

Zymomonas mobilis 113S un 29191 (Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcija) kultivēja periodiskā procesā bez aerācijas barotnē ar sastāvu (g/l): KH_2PO_4 , 2.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0; rauga ekstrakts (*Sigma*), 5.0 un piemērots oglekļa avots (glikoze vai saharoze) koncentrāciju diapazonā 0.14 - 1.11M, pH 5.5. Kultivēšanas process veikts dažādās temperatūrās (25, 30 un 37°C), ar vai bez alifātiskiem spirtiem (butanols, pentanols, heptanols, oktanols, tetradekanols, heksadekanols) koncentrāciju diapazonā 0.04 - 1mM vai deterģentiem (Tween20, Tween80) koncentrācijā 0.049 un 0.046mM, attiecīgi.

Lactobacillus acidophilus La5 un *Bifidobacterium lactis* Bb12 (Chr. Hansen Appl. Technol. Lab., Denmark) kultivēja aerobos vai anaerobos (BBL Gas Pak 150™ System, USA) apstākļos, 37°C, MRS barotnē ar sastāvu (g/l) peptons, 10.0; liellopa gaļas ekstrakts, 8.0; nātrija acetāts, 5.0; rauga ekstrakts (*Sigma*), 4.0; amonija citrāts, 2.0; KH_2PO_4 , 2.0; Tween 80, 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.05 un piemērots oglekļa avots (glikoze, saharoze vai laktoze) koncentrāciju diapazonā 2% - 5%, pH 6.5, 18 vai 48 stundas.

Šūnu sagatavošana hidrofobitātes mērījumiem

Lai veiktu ŠVH mērījumus, šūnas, kas sasniegušas vēlamā kultivēšanas fāzi, nodalīja no kultūršķīduma centrifugējot (5000×g, 10 min, 20°C), mazgāja 50mM fosfāta buferī (pH 7.1), resuspendēja tajā pašā buferšķīdumā, lai optiskais blīvums pie 660 nm (OD_{660}) būtu 0.5. Relatīvā ŠVH tika novērtēta ar MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon) metodi (Aono & Kobayashi, 1997), izmantojot o-ksilolu (*Sigma*). Rezultātu aprēķināja pēc vienādojuma $H\% = [(A_K - A_P)/A_K] \times 100$, kur A_K ir optiskais blīvums (OD_{660}) suspensijai bez o-ksilola (kontrolē), A_P – optiskais blīvums (OD_{660}) paraugam, kam pievienoja o-ksilolu (Aono & Kobayashi 1997 pēc Rosenberg & Doyle 1990).

ŠVH noteica arī ar SAT testu (Salt Aggregation Test) saskaņā ar standarta procedūru (Lindahl *et al.*, 1981), t. i. zemākā $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ koncentrācija izraisa baktēriju agregāciju. Visi rezultāti salīdzināti ar pozitīvo kontroli, t. i. reakcijas rezultātu pie lielākās izsālīšanas aģenta koncentrācijas (4M). Baktēriju suspensiju ($5 \cdot 10^9$ šūnu/ml) sajauktu ar 2mM fosfāta buferi (pH 6.8) bez izsālīšanas aģenta izmantoja kā negatīvo kontroli (Lindahl *et al.*, 1981).

Šūnu sagatavošana un inkubācijas apstākļi

Šūnas, kas sasniegušas vēlīni logaritmisko fāzi ($\mu = 0.150 - 0.20 \text{ h}^{-1}$), nodalīja no kultūršķīduma centrifugējot (5000×g, 10 min, 20°C) un mazgāja 50mM Tris/malāta buferī (pH 5.3). Inkubācijas veiktas tajā pašā buferī, kas satur saharozi (10mM) un šūnas (biomasas koncentrācija 2.0 – 2.5 mg/ml) (kontrolē), un pārbaudāmos membranotropos savienojumus (alifātiskie spirti no 1-butanola līdz 1-heksadekanolam) vai deterģentus (Tween) koncentrācijā 0.04 – 1mM. Pēc 30 min šūnu izturēšanas attiecīgajos apstākļos (30°C), tās nodalīja no kultūršķīduma centrifugējot (7000×g, 10 min) un supernatantu glabāja uz ledu turpmākajiem testiem.

Sasaldēšanas/atkausēšanas, liofilizēšanas un kriokonservācijas procedūras

5 – 10 ml šūnu suspensijas ($8 \cdot 10^{10}$ šūnu/ml) ūdenī sasaldē (-20°C) un turpmāk atkausē (30°C, 30 min) vai glabā (pie -20°C, 6 mēnešus). Sasaldēto šūnu suspensiju liofilizē, izmantojot laboratorijas liofilizatoru (LGA 05, VEB MLW, Leipzig, Germany) pastāvīgā temperatūrā (-20°C) un 0.4 Pa vakuuma spiedienā, 16 st. Paraugus ar liofilizētām šūnām glabā nesasaldējot un bez ārēja mitruma piekļuves (eksikatorā virs silikagela, 4°C) 5 – 7 dienas. Liofilizēto šūnu rehidratāciju veic 30°C, 30 min., izmantojot tādu pašu sterila ūdens daudzumu, ko izmantoja sākotnējās suspensijas pagatavošanā. Šūnu dzīvotspēju pēc sasaldēšanas, liofilizēšanas vai kriokonservācijas noteica ar standarta sēriju atšķaidīšanas metodi. *Z. mobilis* šūnu suspensiju (3 paralēles) ienesa Petrī platēs ar agara barotni un inkubēja 30°C, 48 – 72st. *L. acidophilus* un *B. lactis* šūnu suspensiju ienesa Petrī platēs ar MRS agara vidi un inkubēja 37°C, 48 – 72st.

Šūnu noturības novērtēšana pēc minerālskābes un žultsskābju iedarbības

Šūnas, kas sasniegušas stacionāro fāzi, nodalīja no kultūršķīduma centrifugējot (7000×g, 10 min, 20°C), resuspendēja MRS barotnē (bez rauga ekstrakta, pH 5.5) tādā pašā tilpumā (šūnu koncentrācija pie OD₅₅₀ = 0.5) un atstāja pielāgoties uz 30 min, 30°C. Šūnu dzīvotspēju noteica pēc protokola (Shalini & Hariom 2009). Baktēriju skaitu izteica kā koloniju veidojošo vienību (log KVV/ml) decimālo logaritmu. Stresa ietekmes iedarbību aprēķināja pēc vienādojuma $\Delta \log KVV = \log \text{kontrolē} (\text{KVV/ml}) - \log \text{testa paraugs} (\text{KVV/ml})$.

Šūnapvalku izdalīšana

Šūnu suspensiju sonicēja 20 min. pie 0.5 kHz ledus-ūdens vannā. Veselas šūnas nodalīja centrifugējot (6000×g, 10 min, 4°C). *Z. mobilis* šūnapvalkus savāca centrifugējot (100000×g, 60 min, 4°C) (Ikawa & Snell, 1960), *L. acidophilus* un *B. lactis* šūnapvalkus izdalīja centrifugējot pie 25000×g, 25 min, 4°C (Aono & Kobayashi, 1997). Šūnapvalkus mazgāja fosfāta buferī un glabāja pie -20°C. Izdalīto šūnapvalku kvalitāti novērtēja ar luminiscences mikroskopu (Olympus BX51).

Analītiskās metodes

Kopējo olbaltumvielu koncentrāciju noteica ar Louri (Folin-Ciocalteu's reagent, Fluka Chem. AG, Switzerland) krāsvielas piesaistes metodi (Lowry *et al.*, 1951).

Fosfātu daudzumu noteica ar adaptēto Bartleta metodi (Bartlett, 1972).

Membrānu kopējo neitrālo ogļhidrātu koncentrāciju novērtēja izmantojot Dreywood's Anthrone reaģentu (Morris, 1948).

LPS no *Z. mobilis* šūnām izdalīja ar adaptēto fenola-ūdens metodi (Westphal, 1952). Ogļhidrātu koncentrāciju LPS frakcijās noteica ar fenola-sērskābes reaģentu (Dubois *et al.*, 1956; Piater, 2005).

Z. mobilis šūnapvalku olbaltumvielas izdalīja ar modificēto vieglās ekstrakcijas metodi (Dyé & Delmotte, 1997).

Ekstracellulārās levansaharāzes (EC 2.4.1.10) aktivitāti inkubācijas vidē noteica spektrofotometriski (UV 260, Shimadzu, Japan) pie $\lambda=330\text{nm}$ ($\xi=0.514 \times 10^{-6}$ l/mol cm), mērot levāna veidošanā izraisītās optiskā blīvuma izmaiņas laikā, un izteica aktivitātes vienībās (U) uz mg šūnu biomasas inkubācijas vidē.

Biomasas koncentrāciju noteica spektrofotometriski pie $\lambda=550\text{nm}$, izmantojot kalibrācijas līkni.

Proteolītisko fermentu (EC 3.4.) kopējo aktivitāti noteica saskaņā ar Kunitz metodi (Kunitz, 1947).

Viena proteīnāzes aktivitātes vienība definēta kā fermenta daudzums, kas vajadzīgs, lai izraisītu optiskā blīvuma pieaugumu par 0.01 pie OD₂₈₀ testa apstākļos (Kabadjova-Hristova *et al.*, 2006).

Šūnu piesaistes novērtēšana hidrofilam un hidrofobam nesējmateriālam

Lai iegūt hidrofilu vai hidrofobu virsmu, standarta mikroskopēšanas priekšmetstiklīņus silanizēja ar 0.02M dimetilhlorosilānu (*Sigma*) un toluolu (*Sigma*) pēc protokola (Batischev & Indenbom, 2004). Hidrofilus vai hidrofobus priekšmetstiklīņus iegremdēja šūnu suspensijā (šūnas ar atšķirīgu virsmas hidrofobitāti 50mM fosfāta buferī pH 7.1), izturēja tajā 40 min un, lai noņemtu nepiesaistītās šūnas, viegli noskaloja ar 0.1M fosfāta buferšķīdumu. Piesaistīto šūnu daudzumu novērtēja ar gaismas mikroskopu, katram paraugam skaitot piesaistīto šūnu skaitu 50 redzes laukos un aprēķinot vidējo. Lai novērtētu šūnu piesaisti pie hidrofilas virsmas, veica arī stikla adhēzijas testu (Pérez *et al.*, 1998), šūnas audzēja tiros standarta stikla stobriņos ar 10 ml barotni 24 stundas.

FT-IS

Šūnu un šūnapvalku FT-IS absorbcijas spektrus reģistrēja ar HTS-XT mikroplašu lasītāju (BRUKER) (Harrigan *et al.*, 2004). Katru paraugu (10 – 30 μl) žāvēja uz 96 vietu silikona-plates pie $T<50^\circ\text{C}$, spektrus reģistrēja viļņu garuma intervālā 4000 – 600 cm^{-1} , paraugu skenējot 64 reizes, ar izšķiršanas spēju 4 cm^{-1} . Datu apstrādi veica ar OPUS 6.5 (BRUKER) programmu; koriģēja spektra bāzes līniju (Rubberband metode) un veica vektoru normalizāciju, kas nepieciešama, lai izlīdzinātu atšķirības, kas radušās dažādas spektra līniju intensitātes, t.i., suspensijas koncentrācijas dēļ starp dažādiem paraugiem (Severcan & Harris, 2012). Spektru analīzei tika izmantoti tikai tie spektri, kuru profils bija

absorbcijas robežās no 0.25 - 0.80, nodrošinot Lamberta-Bugēra-Bēra likuma izpildīšanos, t. i. intensitāte ir tieši proporcionāla koncentrācijai.

Fluorescences titrēšanas mērījumi

Z. mobilis šūnu suspensiju (3.0 mg/ml šūnu 50mM fosfāta buferī pH 7.1) titrēja ar 1-*N*-Fenilnaftilamīnu (fluorescentā PNA zonde) (Träuble & Overath, 1973), palielinot zondes koncentrāciju vidē no 1μM līdz 5μM. PNA fluorescenci mērīja pie ierosmes viļņu garuma (λ_1) 345 nm un emisijas viļņu garuma (λ_2) 405 nm ar Fluorichrom (Varian, Inc., CA, US) fluorimeteru aprīkotu ar Coach (Couch Suplex MA, US) programmu (Tsuchido *et al.*, 1989).

Datu apstrāde un analīze

Visi rezultāti iegūti vismaz trīs neatkarīgos mēģinājumos.

Mērījumu vērtības pārstāv vismaz trīs paralēlus atkātojumus.

Faktoreksperimenti realizēti atbilstoši 2^2 , 3^2 (centrālie un vienmērīgie plāni) faktoru gradācijām.

Datu apstrādei izmantotas dispersijas analīzes (MANOVA) multiplās, lineārās un nelineārās regresijas metodes ar Statgraphics[®] Plus (Manugistics, Inc., US) un SPSS 11.0 for Windows (SPSS Inc. Ill., US) programmām ar faktoru efektu izvērtējumu pēc F-testa.

Izmantotas vismaz 200 KVV (koloniju veidojošās vienības) katram šūnu paraugam, lai aprēķinātu dzīvotspējas samazinājumu, to izsakot log vienībās ($\Delta \log KVV$).

REZULTĀTU PĀRSKATS

I. Iespēju, ka Gram-negatīvajām baktērijām *Z. mobilis* un Gram-pozitīvajām baktērijām *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 ir atšķirīga ŠVH un to var ietekmēt dažādi ārējie faktori (temperatūra un augšanas fāze, oglekļa avots un tā koncentrācijas, aeroba vai anaeroba vide, membranotrofo savienojumu klātbūtne), apstiprina ŠVH vērtības, kas iegūtas celmus vienlaicīgi audzējot dažādos apstākļos. Ir noteikts, ka Gram-negatīvās baktērijas *Z. mobilis* ir izteikti hidrofilas salīdzinājumā ar Gram-pozitīvām baktērijām *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 (Tabula 1). Līdztekus, novērots, ka visu pārbaudīto celmu ŠVH ietekmē gan augšanas fāze, gan arī izmantotais oglekļa avots (Tabula 1).

Tabula 1. *Z. mobilis*, *L. acidophilus* un *B. lactis* šūnu virsmas hidrofobitātes izmaiņas atkarībā no kultivēšanas fāzes un oglekļa avota (Zikmanis *et al.*, 2007; Shakirova *et al.*, 2010).

Celms	Hidrofobitāte, % ± S.K.			
	Augšanas fāze			
	Logaritmiskā fāze		Stacionārā fāze	
	Oglekļa avots			
	Glikoze	Saharoze	Glikoze	Saharoze
ZM 29191	4.15 ± 0.19	5.25 ± 0.19	6.19 ± 0.19	6.22 ± 0.19
ZM 113S	10.10 ± 0.19	13.75 ± 0.19	18.07 ± 0.19	22.61 ± 0.19
La5	41.10 ± 0.47	55.50 ± 0.33	57.40 ± 0.47	60.40 ± 0.33
Bb12	56.80 ± 0.89	61.20 ± 0.70	60.27 ± 0.89	62.27 ± 0.70

Z. mobilis, kā arī probiotisko baktēriju *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 ŠVH ievērojami paaugstinājās tieši proporcionāli palielinoties oglekļa avota koncentrācijai vidē (Tabula 2). Saharozes barotnē audzēto *Z. mobilis* un laktozes barotnē audzēto *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 šūnu hidrofobitāte bija visaugstākā (Tabula 2).

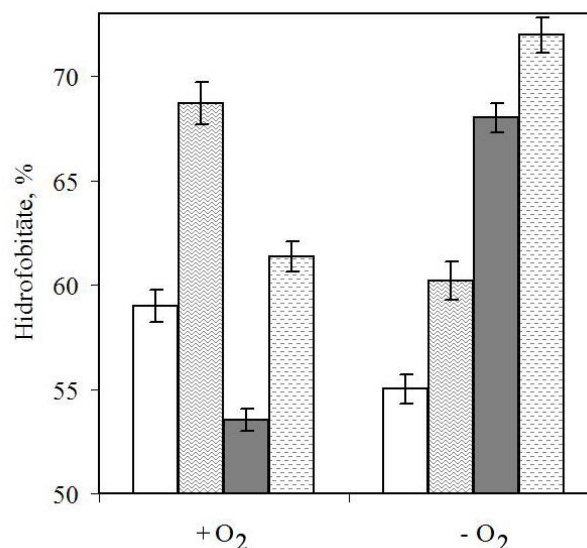
Līdzīgā veidā *Z. mobilis* ŠVH ietekmēja kultivācijas temperatūras izmaiņas (no pazeminātas 25° līdz paaugstinātai 37°) (Tabula 2). ŠVH vērtības, kas iegūtas, izmantojot MATH un SAT testu, bija pilnīgi korelējošas (Tabula 2). Savukārt, abu probiotisko kultūru *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 ŠVH kultivācijas temperatūras izmaiņas būtiski neietekmēja (dati nav parādīti).

Jāatzīmē, ka prebiotika levāna (β-2,6-polifruktāns) klātbūtne kultivēšanas vidē ar laktozi būtiski ietekmēja *L. acidophilus* La5 ŠVH. Tā, piemēram, 1% līdz 4% levāna pievienošana kultivācijas videi palielināja ŠVH no 62% līdz 82% (Shakirova *et al.*, 2013).

Savukārt, tika konstatēts, ka skābeklis kultivācijas laikā atšķirīgi ietekmēja *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 ŠVH. Tā, audzējot *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 aerobos apstākļos ŠVH attiecīgi palielinājās un pazeminājās. Tajā pašā laikā, anaerobos apstākļos tika novērota pretēja ietekme uz ŠVH (3.1. attēls).

Tabula 2. *Z. mobilis* 113S, *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 šūnu virsmas hidrofobitātes izmaiņas dažādos kultivācijas apstākļos (Zikmanis *et al.*, 2007; Shakirova *et al.*, 2013).

Celms	Kultivācijas apstākļi			Hidrofobitāte, % ± S.K.	Šūnu agregācija, M
	Oglekļa avots	Koncentrācija, M	Temperatūra, °C		
ZM113S	Glikoze	0.16	30	15.59 ± 0.47	>2.0
		0.28	30	20.38 ± 0.68	1.8
		0.56	30	39.82 ± 0.45	0.8
	Saharoze	0.16	30	19.12 ± 0.33	1.8
		0.28	30	29.95 ± 0.70	1.4
		0.56	30	66.74 ± 0.16	0.2
	Glikoze	0.28	25	19.17 ± 0.61	1.8
		0.28	30	23.18 ± 0.61	1.6
		0.28	37	43.25 ± 0.61	0.8
O ₂ klātbūtne					
La5	Glikoze	0.13	+	57.40 ± 0.47	n. n.
		0.26	+	62.90 ± 0.68	n. n.
		0.39	+	66.87 ± 0.45	n. n.
	Saharoze	0.13	+	60.40 ± 0.33	n. n.
		0.26	+	64.30 ± 0.70	n. n.
		0.39	+	67.90 ± 0.16	n. n.
	Laktoze	0.13	+	68.45 ± 0.61	n. n.
		0.29	+	70.23 ± 0.61	n. n.
		0.39	+	75.13 ± 0.61	n. n.
Bb12	Glikoze	0.13	—	60.27 ± 0.89	n. n.
		0.26	—	64.56 ± 0.80	n. n.
		0.39	—	70.40 ± 0.80	n. n.
	Saharoze	0.13	—	62.27 ± 0.70	n. n.
		0.26	—	66.40 ± 1.06	n. n.
		0.39	—	72.75 ± 0.70	n. n.
	Laktoze	0.13	—	72.75 ± 0.60	n. n.
		0.26	—	76.75 ± 0.65	n. n.
		0.39	—	79.37 ± 1.00	n. n.



3.1. att. *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 šūnu virsmas hidrofobitātes izmaiņas atkarībā no oglekļa avota un skābekļa klātbūtnes: □ - *L. acidophilus* La5 (0.13M glikoze); ▨ - *L. acidophilus* La5 (0.13M laktoze); ■ - *B. lactis* Bb12 (0.13M glikoze); ▩ - *B. lactis* Bb12 (0.13M laktoze) (Sakirova *et al.*, 2013).

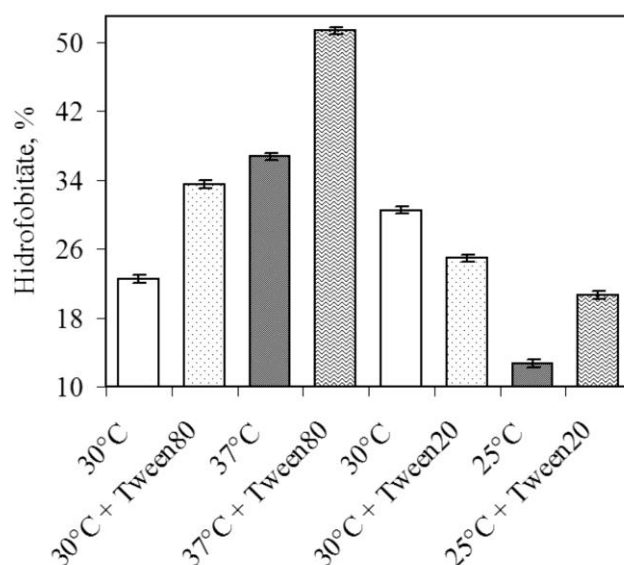
Tika konstatēts, ka membranotropo savienojumu (alifātiskie spirti un Tween-tipa deterģenti) pievienošana audzēšanas videi būtiski ietekmē *Z. mobilis* virsmas īpašības. Lielākais ŠVH un kopējo olbaltumvielu koncentrācijas vidē pieaugums un levānsaharāzes aktivitātes samazināšanās bija zemāko spirtu klātbūtnē, tieši proporcionāli alifātiskā spirta ķēdes garumam (n-butanols – n-heptanols) salīdzinājumā ar augstākiem spirtiem (Tabula 3). Tween-tipa deterģentu ietekme uz *Z. mobilis* šūnu virsmas īpašībām parādījās kā neliels, bet statistiski būtisks hidrofobitātes, levānsaharāzes aktivitātes un kopējo olbaltumvielu koncentrācijas vidē samazinājums Tween20 klātbūtnē un kā izteikti pretējs efekts Tween80 klātbūtnē (Tabula 3).

Tabula 3. *Z. mobilis* 113S šūnu virsmas hidrofobitātes, levānsaharāzes aktivitātes un olbaltumvielu sekrēcijas modulēšana ar membranotropiem savienojumiem (Zikmanis *et al.*, 2005; Zikmanis *et al.*, 2007).

Membranotropie savienojumi	Koncentrācija	Šūnu virsmas parametru izmaiņas			
		Hidrofobitāte, % ± S.K.	Šūnu agregācija, M	Levānsaharāzes aktivitāte, (% pret kontroli)	Olbaltumvielu sekrēcija, (% pret kontroli)
Nav	-	21.87 ± 1.84	1.8	100.00	100.00
n-butanols	1mM	28.80 ± 1.30	1.4	97.95	126.83
n-pentanols	1mM	35.60 ± 0.89	1.0	88.04	145.82
n-heptanols	1mM	41.78 ± 0.35	0.8	64.73	157.46
n-dodecanols	40μM	22.98 ± 0.41	1.8	81.30	133.29
n-tetradecanols	40μM	23.37 ± 0.97	1.6	78.95	119.58
Tween80	46μM	56.54 ± 0.26	≤0.4	127.00	121.00
Tween20	49μM	17.30 ± 0.53	>2.0	70.00	115.00

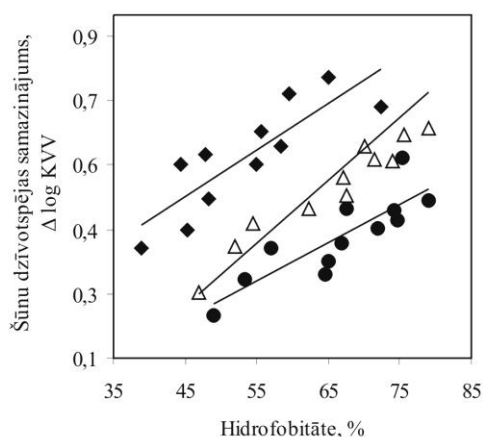
Veicot 2²-faktoreksperimentu, kurā vienlaicīgi kombinēti divi faktori (membranotropie savienojumi un kultivācijas temperatūra), apstiprinājās nozīmīgs ($P < 0.001$) abu faktoru iedarbības efekts uz *Z. mobilis* virsmas īpašībām, kā arī šo faktoru mijiedarbība (3.2. attēls). Viena neatkarīgā mainīgā (temperatūra) ietekme uz atkarīgo mainīgo (ŠVH) mainījās atkarībā no otrā neatkarīgā mainīgā (membranotropie savienojumi). Tātad, ŠVH samazinājums, ko izraisa pazemināta temperatūra (25°) lielā mērā tika „noņemts” ar Tween20 iedarbību (3.2. attēls). Paaugstinātas temperatūras (37°) un Tween80 vienlaicīga iedarbība izpaudās kā nedaudz samazināts abu faktoru mijiedarbības efekts, salīdzinājumā ar abu faktoru individuālo iedarbību (3.2. attēls). Tika konstatēta antagoniska

mijiedarbība dažādās citu faktoru kombinācijās (Tween80, pazemināta kultivācijas temperatūra u. c.), tomēr, augstākas *Z. mobilis* ŠVH vērtības (~50%) tika panāktas ar vienlaicīgu paaugstinātas temperatūras un Tween80 iedarbību (3.2. attēls).

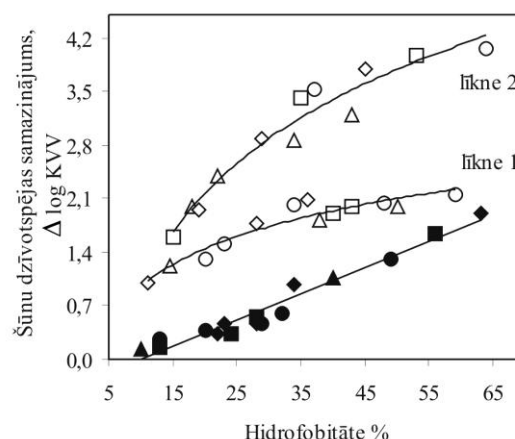


3.2. att. Deterģentu un temperatūras ietekme uz *Z. mobilis* 113S šūnu virsmas hidrofbitāti (Zikmanis *et al.*, 2007).

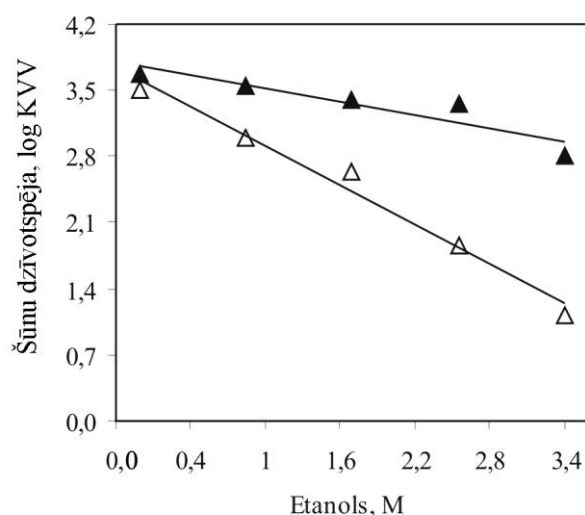
II. Ir noskaidrots, ka *Z. mobilis*, *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 dzīvotspēja nelabvēlīgos ārvides apstākļos (sasaldēšana/atkausēšana, liofilizēšana/rehidratācija un kriokonservācija) korelē ar intakto ŠVH vērtībām. Tika parādīta apgriezta lineāra sakarība (3.3. un 3.4. attēls) starp ŠVH un šo baktēriju celmu dzīvotspēju sasaldēšanas/atkausēšanas, liofilizēšanas/rehidratācijas un kriokonservācijas laikā. Savukārt, *Z. mobilis* dzīvotspēja paaugstinātu etanola koncentrāciju apstākļos samazinājās, pieaugot intakto baktēriju ŠVH vērtībām. Pakļaujot šūnas fiksētās (3.4. attēls) vai pieaugošās (3.5. attēls) etanola koncentrācijas iedarbībai, mazākais dzīvotspējas kritums bija šūnām ar zemākām ŠVH vērtībām (diapazonā no 24% līdz 56%).



3.3. att. *L. acidophilus* La5 šūnu dzīvotspējas samazinājums sasaldēšanas/atkausēšanas laikā (♦) ($r = 0.849$, $P < 0.01$) un *B. lactis* Bb12 šūnu dzīvotspējas samazinājums sasaldēšanas/atkausēšanas (●) ($r = 0.854$, $P < 0.01$) un kriokonservācijas (Δ) ($r = 0.843$, $P < 0.01$) laikā atkarībā no šūnu virsmas hidrofbitātes (Shakirova *et al.*, 2013).

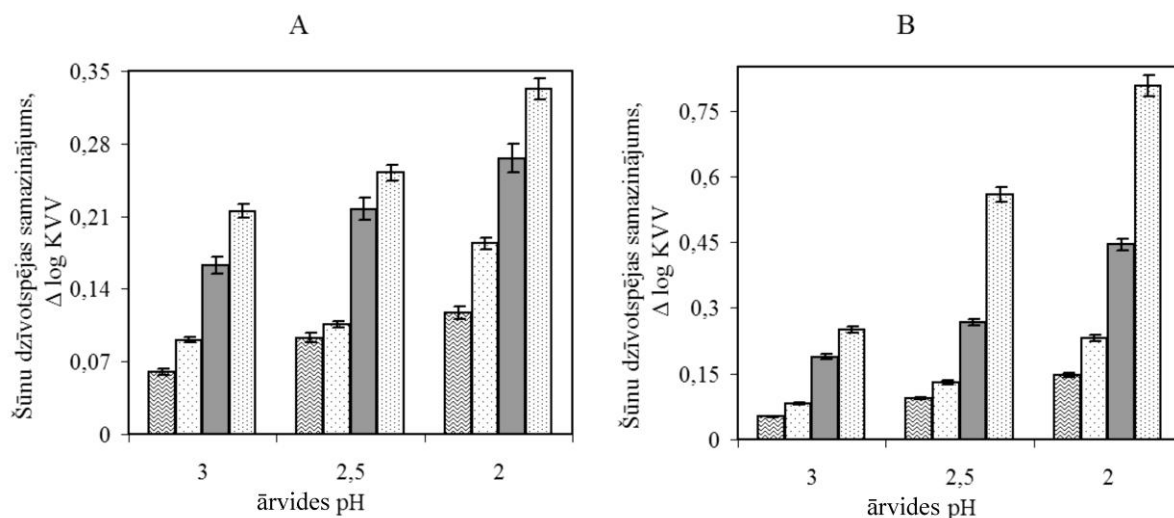


3.4. att. *Z. mobilis* 113S šūnu dzīvotspējas samazinājums sasaldēšanas/atkausēšanas (tukšie simboli, līkne 1 ($r = 0.973$, $P < 0.001$), liofilizēšanas/rehidratācijas laikā (līkne 2 ($r = 0.958$, $P < 0.001$) vai 2.55 M etanola iedarbības laikā (pildītie simboli, $r = 0.976$, $P < 0.001$) atkarībā no šūnu virsmas hidrofbitātes. Dažādi simboli atbilst neatkarīgu eksperimentu datiem (Shakirova *et al.*, 2008).



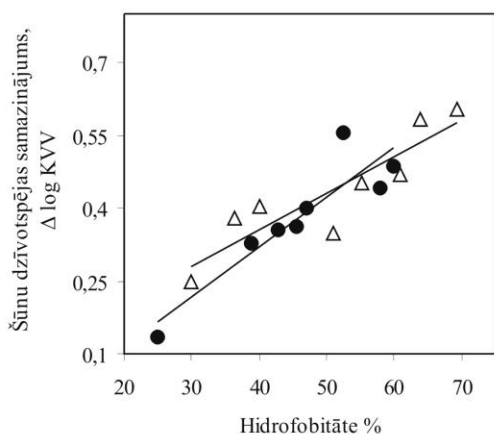
3.5. att. *Z. mobilis* šūnu dzīvotspējas samazinājums vidē ar pieaugošu etanola koncentrāciju atkarībā no šūnu virsmas hidrofbitātes ((pildītie simboli) ŠVH = 24% ($r = -0.918$, $P < 0.02$) un (tukšie simboli) ŠVH = 56% ($r = -0.989$, $P < 0.01$)) (Shakirova *et al.*, 2008).

Citi fizioloģiskie faktori, kas var ietekmēt šūnu, īpaši *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 dzīvotspēju, ir zems pH un paaugstinātas žultsskābes koncentrācijas vidē. Ir noteikts, ka abu probiotisko baktēriju celmu dzīvotspēja būtiski samazinājās jau pēc 30 min. inkubācijas vidē ar pH 3 (3.6. attēls).

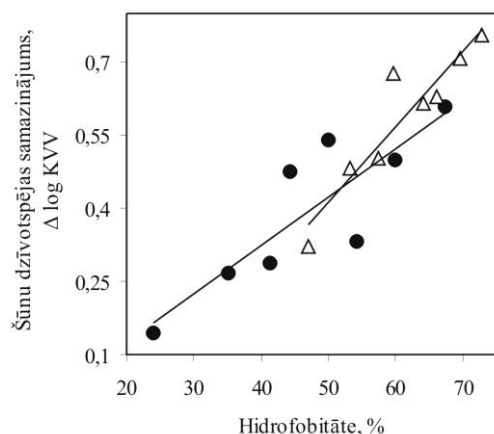


3.6. att. *L. acidophilus* La5 (A) (▨ - 30 min, ŠVH = 35%; □ - 30 min, ŠVH = 54%, ■ - 120 min, ŠVH = 35%; ▩ - 120 min, ŠVH = 54%) un *B. lactis* Bb12 (B) (▨ - 30 min, ŠVH = 52.7%; □ - 30 min, ŠVH = 69.5%; ■ - 120 min, ŠVH = 52.7%; ▩ - 120 min, ŠVH = 69.5%) dzīvotspējas samazinājums atkarībā no vides pH (Shakirova *et al.*, 2013).

Lielākais *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 dzīvotspējas kritums (attiecīgi, 46% un 84%) tika novērots pēc 120 min inkubācijas vidē ar pH 2 (3.7. attēls). Tajā pašā laikā abu celmu dzīvotspēja vidē ar zemu pH (3.7. attēls) vai ar 3% žultsskābi (3.8. attēls) bija apgriezti proporcionāla ŠVH, apstiprinot, ka hidrofbām šūnām ir ievērojami samazināta spēja izdzīvot nelabvēlīgos apstākļos.



3.7. att. *L. acidophilus* La5 (●) ($r = 0.912$, $P < 0.01$) un *B. lactis* Bb12 (Δ) ($r = 0.896$, $P < 0.01$) dzīvotspējas samazinājums minerālskābes klātbūtnē (HCl, pH 2, 120 min) atkarībā no šūnu virsmas hidrofobitātes (Shakirova *et al.*, 2013).



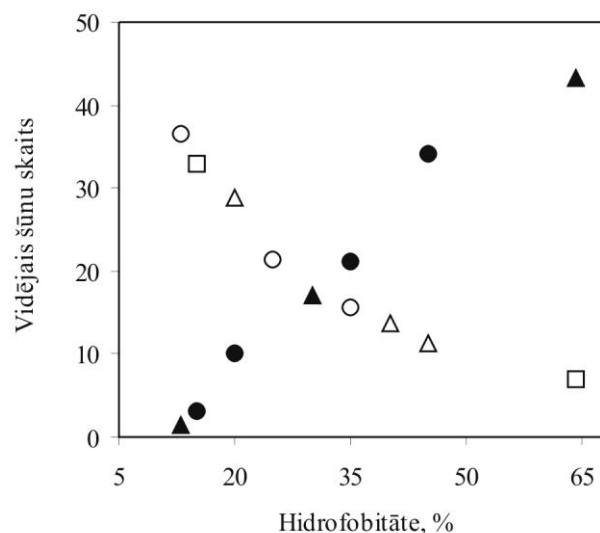
3.8. att. *L. acidophilus* La5 (●) ($r = 0.862$, $P < 0.01$) un *B. lactis* Bb12 (Δ) ($r = 0.935$, $P < 0.01$) dzīvotspējas samazinājums 3% žultsskābes klātbūtnē (120 min) atkarībā no šūnu virsmas hidrofobitātes (Shakirova *et al.*, 2013).

Pēc šūnu *B. lactis* Bb12 inkubācijas vidē ar minerālskābi (HCl) vai žultsskābi to ŠVH samazinājas. Izteiktāks ŠVH samazinājums tika novērots 3% žultsskābes klātbūtnē, īpaši hidrofilām šūnām. Minerālskābes ietekme uz ŠVH bija līdzīga, tomēr mazāk izteikta (Tabula 4).

Tabula 4. *Bifidobacterium lactis* Bb12 šūnu virsmas hidrofobitātes izmaiņas minerālskābes un žultsskābes klātbūtnē (Shakirova *et al.*, 2013).

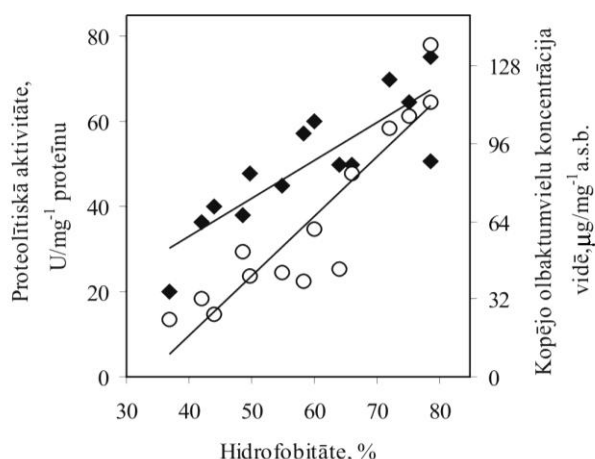
Skābe	Hidrofobitāte, %		
	± S.K.		
	Kontrole (neskartās šūnas)	Pēc inkubācijas (120 min)	Relatīvais samazinājums
HCl (pH 2)	55.6 ± 0.17	51.1 ± 0.19	8.1
	57.3 ± 0.19	55.0 ± 0.16	4.0
Žultsskābe (3%)	47.2 ± 0.18	20.0 ± 0.20	57.6
	61.2 ± 0.18	34.1 ± 0.19	44.3

Konstatēts, ka daudzveidīgu vides faktoru izraisītas šūnu virsmas īpašību izmaiņas (Tabula 2, 3) atšķirīgi ietekmē baktēriju *Z. mobilis* spēju piesaistīties hidrofilām un hidrofobām virsmām. Šūnu adhēzija silanizētai (t.i. hidrofobai) stikla virsmai bija tieši proporcionāla ŠVH (3.9. attēls). Turpretim, apgriezti proporcionāla sakarība tika novērota šūnu adhēzijā tīrai (hidrofilai) stikla virsmai (3.9. attēls), apstiprinot, ka *Z. mobilis* šūnu adhēzijas spējas ir atkarīgas no virsmas hidrofobitātes.

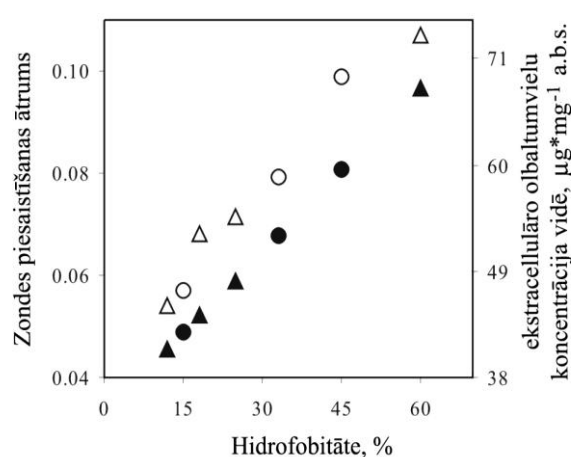


3.9. att. *Z. mobilis* 113S šūnu piesaistīšanās hidrofilam (tukšie simboli) un hidrofobam (pildītie simboli) stiklam atkarībā no šūnu virsmas hidrofobitātes. Dažādi simboli atbilst neatkarīgu eksperimentu datiem (Zikmanis *et al.*, 2007).

Lai noskaidrotu *Z. mobilis* 113S un *L. acidophilus* La5 barjerfunkcijas (membrānu caurlaidība) atkarību no ŠVH, tika noteikta levānsaharāzes un proteolītiskā aktivitāte, kā arī kopējo olbaltumvielu sekrēcija vidē. Konstatēts, ka gan *L. acidophilus* La5 šūnu proteolītiskā aktivitāte, gan kopējo olbaltumvielu sekrēcija vidē inkubācijas laikā, ir būtiski atkarīgas no ŠVH. Sekretējamo olbaltumvielu koncentrācija un proteolītisko fermentu aktivitāte palielinājās tieši proporcionāli ŠVH pieaugumam (3.10. attēls). Piekam, *Z. mobilis* kopējo olbaltumvielu koncentrācijas pieaugums vidē kopā ar ŠVH pieaugumu (3.11. attēls) visticamāk norāda uz palielinātu membrānu caurlaidību hidrofobās šūnās. Savukārt, *Z. mobilis* šūnu levānsaharāzes aktivitāte vidē bija apgriezti proporcionāla hidrofobitātes vērtībām (Zikmanis *et al.*, 2007). *Z. mobilis* šūnu virsmas caurlaidību novērtēja arī ar fluorescento titrēšanu, izmantojot hidrofobo fluorescento PNA (1-*N*-Fenilnaftilamīns) zondi. Tika parādīts, ka PNA zondes piesaistīšanas ātrums (zondes fluorescences pieauguma sākuma ātrums) ir tieši proporcionāls ŠVH ($r = 0.968$; $P < 0.001$) (3.11. attēls).

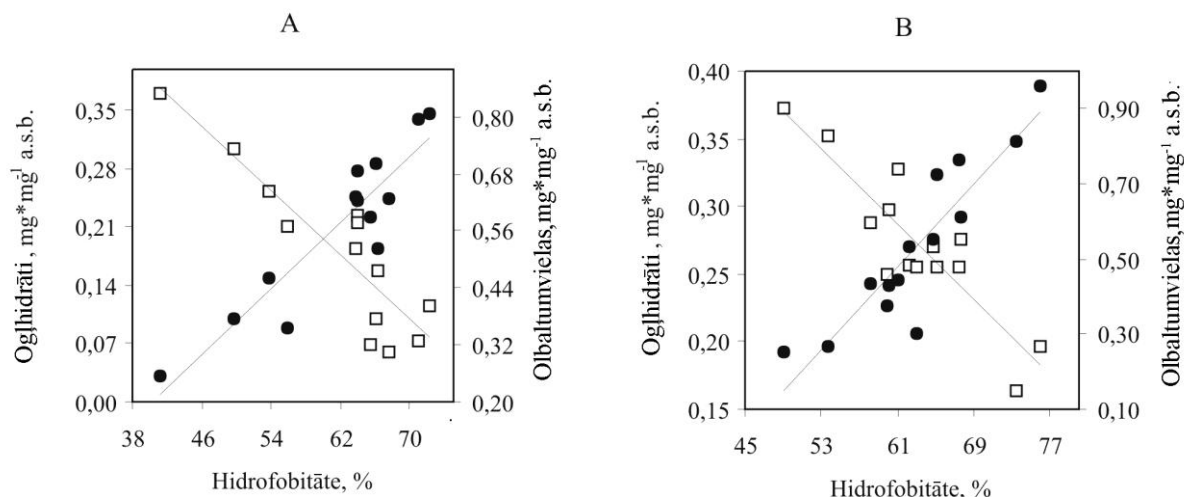


3.10. att. *L. acidophilus* La5 proteolītiskā aktivitāte (♦) ($r = 0.846$, $P < 0.01$) un kopējo olbaltumvielu daudzums vidē (○) ($r = 0.706$, $P < 0.01$) inkubācijas laikā atkarībā no šūnu virsmas hidrofobitātes (Shakirova *et al.*, 2013).

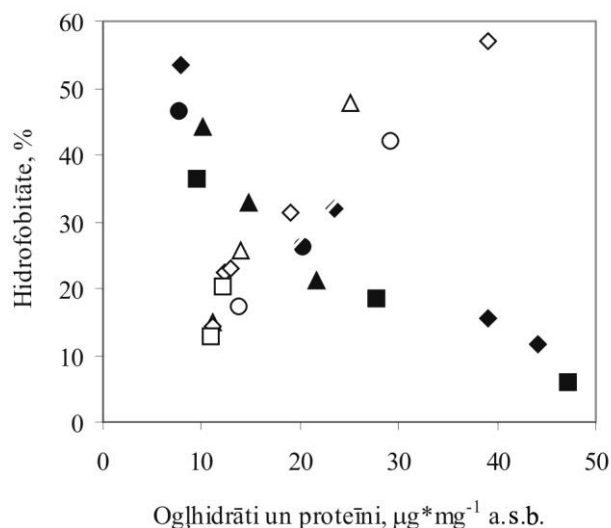


3.11. att. PNA zondes piesaistīšanas ātrums *Z. mobilis* 113S šūnām (tukšie simboli) un ekstracellulāro olbaltumvielu koncentrācija vidē (pildītie simboli) atkarībā no šūnu virsmas hidrofobitātes. Dažādi simboli atbilst neatkarīgu eksperimentu datiem. (Zikmanis *et al.*, 2007).

III. Olbaltumvielu, lipīdu un ogļhidrātu koncentrācijas *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 un *Z. mobilis* 113S šūnapvalkos tika noteiktas ar analītiskās ķīmijas metodēm. Konstatēts, ka šūnapvalku komponentu bioķīmiskie rādītāji visiem analizētajiem celmiem ar dažādu ŠVH veido būtiskas savstarpējas korelācijas (3.12. un 3.13. attēls). Palielinoties abu probiotisko celmu ŠVH, ogļhidrātu koncentrācija samazinājās, bet olbaltumvielu un lipīdu koncentrācijas palielinājās hidrofofajās šūnās (3.12. attēls). Tajā pašā laikā, *Z. mobilis* hidrofofo šūnu LPS frakcijā ogļhidrātu daudzums samazinājās (3.13. attēls) vienlaikus proporcionāli samazinoties ketodioksiglikonskābes (KDO) koncentrācijai ($r = -0.929$, $P < 0.001$) attiecīgajos LPS paraugos (Shakirova *et al.*, 2008). Gluži pretēji, no *Z. mobilis* šūnapvalka izdalīto olbaltumvielu daudzums pieauga tieši proporcionāli ŠVH pieaugumam (3.13. attēls). Būtiskās ($P < 0.01$) korelācijas norāda, ka abu hidrofilo (ogļhidrāti/LPS) un hidrofofo (virsmas proteīni un lipīdi) šūnapvalku komponentu proporcijas varētu noteikt baktēriju ŠVH.



3.12. att. Ogļhidrātu koncentrācija (□) ($r = -0.896$, $P < 0.01$ (A) un $r = -0.893$, $P < 0.01$ (B)) un olbaltumvielu koncentrācija (●) ($r = 0.921$, $P < 0.01$ (A) un $r = 0.906$, $P < 0.01$ (B)) *L. acidophilus* La5 (A) un *B. lactis* Bb12 (B) šūnapvalkos atkarībā no šūnu virsmas hidrofofītātes (Shakirova *et al.*, 2013).



3.13. att. *Z. mobilis* 113S šūnu ogļhidrātu koncentrācija (pildītie simboli, $r = -0.957$, $P < 0.001$) lipopolisaharīdos un virsmas proteīnu koncentrācija (tukšie simboli, $r = 0.971$, $P < 0.001$) atkarībā no šūnu virsmas hidrofofītātes. Dažādi simboli atbilst neatkarīgu eksperimentu datiem (Shakirova *et al.*, 2008).

L. acidophilus La5, *B. lactis* Bb12 un *Z. mobilis* 113S šūnapvalku analīze, izmantojot FT-IR, parādīja būtiskas bioķīmiskā sastāva atšķirības atkarībā no baktēriju ŠVH. Šo baktēriju šūnapvalku spektros parādījās ievērojamas lipīdu ($3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$), olbaltumvielu ($1700 - 1500\text{ cm}^{-1}$) un ogļhidrātu ($1200 - 900\text{ cm}^{-1}$) absorbcijas joslu intensitātes un viļņu skaitļa nobīdes (Tabula 5). Salīdzinot *Z. mobilis* hidrofilo un hidrofobo šūnu frakciju spektrus atklājās, ka mainās gan absorbcijas joslu intensitātes, gan viļņu skaitļi, t. i. to maksimumu atrašanās vieta (Tabula 6).

Z. mobilis 113S, kā arī *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 šūnapvalku spektru apgabalā starp $3000\text{ cm}^{-1} - 2800\text{ cm}^{-1}$, kurā identificējās taukskābju ķēdes, t. i. membrānu fosfolipīdi, asimetrisko un simetrisko metil- (attiecīgi $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ un $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$) un metilēngrupu (attiecīgi $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ un $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$) svārstību absorbcijas līniju intensitāšu pieaugums bija tieši proporcionāls ŠVH (Tabula 5). Turklāt tika konstatēta arī apgriezti proporcionāla sakarība starp šo baktēriju ŠVH un metilēngrupu asimetrisko un simetrisko svārstību (attiecīgi $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ un $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$) joslu viļņu skaitļa nobīdes (Tabula 5).

Spektra apgabalā starp 1745 cm^{-1} un 1735 cm^{-1} , kurā parādās alkilesteru un taukskābju absorbcijas līnijas, *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 ŠVH izmaiņas bija tieši proporcionālas alkilesteru ($>\text{C}=\text{O str}$) absorbcijas līniju intensitāšu izmaiņām (Tabula 5).

Spektra apgabalā starp 1700 cm^{-1} un 1500 cm^{-1} (Amīds I, Amīds II un olbaltumvielu un peptīdu C–N svārstību absorbcijas līnijas) tika konstatēta tieši proporcionāla sakarība starp *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 ŠVH un Amīda I un Amīda II joslu viļņu skaitļa nobīdes (Tabula 5). Savukārt attiecīgi tieša un apgriezta sakarība parādījās starp Amīda II un Amīda I joslu viļņu skaitļa nobīdes un *Z. mobilis* 113S ŠVH (Tabula 5).

Spektra apgabalā starp $1200\text{ cm}^{-1} - 900\text{ cm}^{-1}$, kas attiecināms uz ogļhidrātiem, parādījās būtiska apgriezta proporcionalitāte starp *Z. mobilis* 113S, *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 ŠVH un ogļhidrātu absorbcijas līnijas ar maksimumu pie 985 cm^{-1} intensitātēm (Tabula 5). Tajā pašā laikā būtiska tieša sakarība parādījās starp šo baktēriju ŠVH un ogļhidrātu joslu viļņu skaitļa nobīdes.

Tabula 5. *Z. mobilis* 113S, *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 FT-IS absorbcijas joslu intensitātes un viļņu skaitļi atkarībā no šūnu virsmas hidrofobitātes (Shakirova *et al.*, 2013).

Parametrs, kas korelē	FT-IS spektru joslu interpretācija un to viļņu skaitļi	Korelācijas koeficients, Spearman's (ρ)		
		ZM113S, n = 21	LA5, n = 13	Bb12, n = 13
ŠVH un absorbcijas joslu intensitāte	$\nu_{as} (CH_3) \sim 2955 \text{ cm}^{-1}$	0.505*	0.829**	0.705**
	$\nu_{as} (CH_2) \sim 2922 \text{ cm}^{-1}$	0.576**	0.898**	0.602*
	$\nu_{sym} (CH_3) \sim 2872 \text{ cm}^{-1}$	0.555**	0.853**	0.641*
	$\nu_{sym} (CH_2) \sim 2852 \text{ cm}^{-1}$	0.580**	0.909**	0.717**
	Amīds I $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$	n. n.	0.872**	0.691**
	Amīds II $\sim 1545 \text{ cm}^{-1}$	n. n.	0.852**	0.603*
	$>C=O \text{ str (esteri)} \sim 1740 \text{ cm}^{-1}$	n. n.	0.697**	0.662*
	$C-O-C, C-O \text{ str (ogļhidrāti)} \sim 985 \text{ cm}^{-1}$	-0.445*	- 0.814**	- 0.735**
ŠVH un svārstību joslas novietojums/viļņu skaitlis (cm^{-1})	$\nu_{as} (CH_2) \sim 2922 \text{ cm}^{-1}$	- 0.649**	- 0.760**	- 0.653*
	$\nu_{sym} (CH_2) \sim 2852 \text{ cm}^{-1}$	- 0.651**	- 0.547*	- 0.645*
	Amīds I $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$	- 0.434*	n. n.	0.584*
	Amīds II $\sim 1545 \text{ cm}^{-1}$	0.469*	0.797**	n. n.
	$C-O-C, C-O \text{ str (ogļhidrāti)} \sim 985 \text{ cm}^{-1}$	0.645**	0.757**	0.405*

** Korelācija ir būtiska 0.01 līmenī.

* Korelācija ir būtiska 0.05 līmenī.

Tabula 6. Absorbcijas joslu intensitātes un viļņu skaitļa variāciju atšķirības starp *Z. mobilis* 113S hidrofilo un hidrofobo šūnu frakcijām (Shakirova *et al.*, 2013).

FT-IS joslas		Šūnu virsmas īpašības	Hidrofilas, n = 10	Hidrofobas, n = 11	Atšķirību būtiskums (p)
Absorbcijas intensitātes, A. U.***					
Grupas, kurām ir absorbcijas intensitātes variācijas	ν_{as} (CH ₃)		62.75 ± 3.25	79.18 ± 5.55	0.0220*
	ν_{as} (CH ₂)		34.80 ± 2.39	47.82 ± 4.53	0.0232*
	ν_{sym} (CH ₃)		97.55 ± 7.89	145.14 ± 15.56	0.0265**
	ν_{sym} (CH ₂)		45.45 ± 4.58	72.45 ± 9.10	0.0017**
	>C=O <i>str</i> (esteri)		27.25 ± 1.30	35.41 ± 2.47	0.0066**
Svārstību joslas maksimuma viļņu skaitlis (cm ⁻¹)					
Svārstību grupas, kurām ir viļņu skaitļa nobīde	ν_{as} (CH ₂)		2924.68 ± 0.21	2923.61 ± 0.27	0.0067**
	ν_{sym} (CH ₃)		2873.93 ± 0.25	2872.48 ± 0.54	0.0373**
	ν_{sym} (CH ₂)		2853.91 ± 0.13	2853.28 ± 0.18	0.0151**
	>C=O <i>str</i> (esteri)		1734.19 ± 0.24	1741.84 ± 0.81	0.0430**
	Amīds I		1654.93 ± 0.14	1653.33 ± 0.87	0.0410**
	Amīds II		1542.89 ± 0.19	1543.41 ± 0.16	0.0480*
C–O–C, C–O <i>str</i> (ogļhidrātos)			970.19 ± 0.67	975.57 ± 1.47	0.0046*

* Parametriskais t - tests

** Neparametriskais W – tests

*** Nosacītās vienības (Arbitrary Units)

Lai noteiktu sakarības starp olbaltumvielu, lipīdu un ogļhidrātu koncentrācijām *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 šūnapvalkos, kas noteiktas bioķīmiski un pēc FT-IS spektru datiem, tikaveikta kvantitatīvā kalibrācija, izmantojot OPUS programmu (2. kārtas polinoma vienādojumi). Dati, kas iegūti izmantojot FT-IS un bioķīmisko analīžu metodes, savstarpēji korelēja (Tabula 7).

Tabula 7. *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 šūnapvalku galveno makromolekulāro komponentu koncentrācijas, kas noteiktas ar ķīmiskajām analīzēm un FT-IS metodi (kalibrācijas vienādojumi) (Shakirova *et al.*, 2013).

Celms	Membrānu ķīmiskā analīze			Membrānu IS-kvantitatīvā analīze ^a		
	Olbaltumvielas	Ogļhidrāti	Lipīdi	Olbaltumvielas	Ogļhidrāti	Lipīdi
	mg/mg ⁻¹ a.s.b. ± S.K.			mg/mg ⁻¹ a.s.b. ± S.K.		
La5	0.572 ± 0.047	0.180 ± 0.017	0.153 ± 0.012	0.569 ± 0.066	0.173 ± 0.027	0.156 ± 0.020
Bb12	0.541 ± 0.028	0.268 ± 0.015	0.105 ± 0.008	0.544 ± 0.101	0.277 ± 0.051	0.101 ± 0.012

^a Vērtības no kvantitatīvās kalibrācijas vienādojumiem, kur: X – absorbcijas pīķu maksimumu intensitāte; Y – komponentes vērtība (olbaltumvielas, ogļhidrāti vai lipīdi), kas aprēķināta no absorbciju intensitātēm (attiecīgi pie 1660 cm⁻¹, 1088 cm⁻¹ un 2930 cm⁻¹).

DISKUSIJA

I. Nosakot *Z. mobilis*, *L. acidophilus* un *B. lactis* celmu ŠVH (Tabula 1), konstatējām, ka Gram-negatīvo baktēriju *Z. mobilis* šūnu virsma ir izteikti hidrofila, salīdzinājumā ar Gram-pozitīvo baktēriju *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 virsmām (Zikmanis *et al.*, 2007; Shakirova *et al.*, 2010). Šie rezultāti atbilst priekšstatiem, ka salīdzinājumā ar Gram-negatīvajām baktērijām, Gram-pozitīvo baktēriju virsma ir hidrofobāka, jo to šūnapvalkos ir vairāk hidrofobo komponentu (Vanhaecke *et al.*, 1990; Aono & Kabayashi, 1997; Nikaido, 2003; Schar-Zammaretti & Ubbink, 2003).

Ir zināms, ka ŠVH ir celmam specifiska īpašība, t. i. mainās plašā diapazonā baktēriju ģinšu ietvaros (Nikovskaya *et al.*, 1989; Aono & Kabayashi, 1997; Kos *et al.*, 2003; Karimi Torshizi *et al.*, 2008). Mūsu pētījumi (Zikmanis *et al.*, 2007; Shakirova *et al.*, 2013) parādīja, ka tā izmainās arī mainoties vides apstākļiem – augšanas fāzei un ātrumam, barotnes sastāvam, temperatūrai u. c. (Tabula 1 un 2).

Dažādi oglekļa avoti var ietekmēt šūnu ārējās membrānas sastāvu, piemēram, palielinoties glikozes koncentrācijai kultivēšanas vidē, izmainās *Z. mobilis* membrānu īpašības (Doelle *et al.*, 1982), kas, iespējams, kļūst hidrofobākas. Līdzīgas izmaiņas novērojām, pārbaudot dažāda oglekļa avota un tā koncentrācijas ietekmi uz *Z. mobilis* ŠVH (Tabula 2) (Zikmanis *et al.*, 2007). Neatkarīgi no izmantotajām substrāta koncentrācijām glikozes barotnē audzēto *Z. mobilis* ŠVH bija zemāka, salīdzinot ar šūnām, kas audzētas uz saharozes. Tajā pašā laikā jāatzīmē, ka laktozes barotnē, salīdzinājumā ar glikozes vai saharozes barotnēm, *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 hidrofobitāte bija visaugstākā (Tabula 2) (Shakirova *et al.*, 2013). Literatūrā ir dati par līdzīgu laktozes efektu uz *Lactococcus lactis* virsmas īpašībām (Kimoto-nira *et al.*, 2010).

Ir zināms, ka fruktānu saturošie prebiotiki (t. sk. levāns) var ietekmēt baktēriju augšanu un dzīvotspēju (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). Mūsu pētījumos novērotais levāna pozitīvais efekts uz *L. acidophilus* La5 ŠVH liecina, ka levāns veicina ne tikai probiotisko baktēriju produktivitāti (Semjonovs *et al.*, 2008), bet arī ŠVH, turklāt izmantojot levānu kombinācijā ar laktozi kultivēšanas vidē var iegūt hidrofobāku šūnu virsmu (līdz 82%) (Shakirova *et al.*, 2013). Tajā pašā laikā, pārbaudot, dažādu sorbitola koncentrāciju ietekmi uz *Z. mobilis* ŠVH, novērojām, ka pie vienādas glikozes koncentrācijas ŠVH palielinās (no 25 līdz 43%) tieši proporcionāli sorbitola koncentrācijai (Zikmanis *et al.*, 2007). Iespējams, ka šādu efektu izsauc osmotiskā gradienta vide-šūnas izmaiņas un attiecīgās kompensējošās reakcijas (Wood, 1999), kas izpaužas struktūras un bioķīmiskā sastāva izmaiņas.

Jāatzīmē, ka audzēšanas temperatūra būtiski neietekmēja abu probiotisko kultūru ŠVH (Tabula 2) (Zikmanis *et al.*, 2007; Shakirova *et al.*, 2013). Novērotais *Z. mobilis* ŠVH palielinājums, pieaugot temperatūrai, (Tabula 2) varētu būt saistīts ar kultivēšanas temperatūras ietekmi uz membrānu sastāvu, jo, palielinoties temperatūrai, membrānās var mainīties taukskābju un fosfolipīdu koncentrāciju proporcijas (Benschoter & Ingram, 1986).

Skābekļa klātbūtne probiotisko baktēriju *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 kultivēšanas laikā atšķirīgi izmainīja ŠVH (3.1. attēls) (Shakirova *et al.*, 2013). Ir zināms, ka skābekļa klātbūtne var ietekmēt *Bifidobacterium spp.* metabolismu un bioķīmiskās īpašības un *L. acidophilus* celms ir vairāk skābekļa-tolerants (Talwalkar & Kailasapathy, 2004). Mūsu pētījumu rezultāti (3.1. attēls) visticamāk norāda uz baktēriju virsmas modifikācijām un strukturālām izmaiņām, ko izsauc skābekļa klātbūtne. Ir ziņots, ka aerobos apstākļos var izmainīt *B. longum* šūnu taukskābju profilu (Talwalkar & Kailasapathy, 2004).

Mūsu pētījumi parādīja, ka, izmantojot alifātiskos spirtus vai Tween-tipa deterģentus, var būtiski modulēt *Z. mobilis* virsmas īpašības (Tabula 3) (Zikmanis *et al.*, 2005; Zikmanis *et al.*, 2007). Alifātiskie spirti nelabvēlīgi ietekmēja levansaharāzes sekrēciju vidē, bet, palielinoties alifātiskā spirta ķēdes garumam, olbaltumvielu koncentrācija vidē un ŠVH palielinājās (Tabula 3). Ir zināms, ka lipofīlie un amfifīlie savienojumi iedarbojas uz šūnu membrānām un pazemina šūnu barjerfunkcijas, vājinot membrānu strukturālo integritāti (Sikkema *et al.*, 1995; Denich *et al.*, 2003). Deterģenti var saistīt membrānu komponentes kompleksos – deterģents-lipīds un/vai deterģents-proteīns, tā ietekmējot membrānu fāžu pāreju un arī attiecības lipīdi/olbaltumvielas samazināšanos, kā arī olbaltumvielu konformācijas izmaiņas, atbilstoši samazinot membrānsaistīto fermentu aktivitāti (Freis, 1977). Piemēram, ramnolipīds pat mazās koncentrācijās, var izraisīt daļēju LPS atraušānu no ārējās

membrānas, tādejādi būtiski palielinot ŠVH (Al-Tahhan *et al.*, 2000). ŠVH palielināšanās dažādu ārvides faktoru kombinēšanās rezultātā (3.2. attēls) (Zikmanis *et al.*, 2007) liecina par iespējām iegūt *Z. mobilis* ar plašā diapazonā modificētām šūnu īpašībām. Savukārt, novērotā antagonistiskā mijiedarbība starp izmantotajiem faktoriem (3.2. attēls) var norādīt uz tieši ietekmēto šūnapvalka komponentu ieguldījumu.

II. Zināms, ka sasaldēšanas laikā veidojas kompleksi nelabvēlīgi apstākļi, kuros mikroorganismiem jāpārcieš nelabvēlīgas fizioloģiskas izmaiņas, t. sk. izmaiņas membrānu fluiditātē un caurlaidībā (de Angelis & Gobbetti, 2004). Kriokonservācijas laikā membrānu integritāte un makromolekulu denaturācija ir atzītas par dzīvotspēju būtiski ietekmējošiem faktoriem (de Angelis & Gobbetti, 2004). Tā, piemēram, pazeminoties temperatūrai, palielinās *L. delbrueckii* īsāko un/vai nepiesātināto taukskābju proporcijas membrānu lipīdos (Bâati *et al.*, 2000). Mūsu pētījumu rezultāti par *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 un *Z. mobilis* 113S dzīvotspēju nelabvēlīgos sasaldēšanas/atkausēšanas apstākļos, kriokonservācijas (3.3. attēls) (Shakirova *et al.*, 2013) vai liofilizēšanas (3.4. attēls) (Shakirova *et al.*, 2008) laikā un dzīvotspējas korelāciju ar baktēriju ŠVH norāda uz strukturālām izmaiņām membrānās, visticamāk membrānu lipīdos, to sasaldēšanas dēļ. Šie rezultāti liecina, ka virsmas hidrofobitāte var palīdzēt šūnām izdzīvot nelabvēlīgos ārvides apstākļos un tāpēc kultivācijas laikā ir jākontrolē ŠVH un jāuztur zemāko vērtību diapazonā, lai samazinātu nevēlamās strukturālās un fizioloģiskās izmaiņas.

Mūsu pētījumi parādīja, ka *Z. mobilis* dzīvotspēju negatīvi ietekmē paaugstinātas etanola koncentrācija un hidrofilām šūnām ir lielākas iespējas izdzīvot šādos nelabvēlīgajos apstākļos (3.4. un 3.5. attēls) (Shakirova *et al.*, 2008). Ir zināms, ka spirtu toksiskā iedarbība ir vērsta uz šūnas hidrofobajām daļām, visticamāk uz to plazmatiskajām membrānām. Etanola un bioloģisko membrānu mijiedarbības rezultāts ir samazināta membrānu integritāte (Sikkema *et al.*, 1995) un ir pierādīts, ka alifātisko spirtu mijiedarbība ar modelmembrānām izraisa fāžu pārejas temperatūras nobīdi (Elias *et al.*, 1976).

Skābju klātbūtne veido būtiskus ārvides stresa apstākļus ar ko PB saskaras KZT (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002; de Angelis & Gobbetti, 2004; Olejnik *et al.*, 2005; Schar-Zammaretti *et al.*, 2005; Ljungh & Wadström, 2006; Karimi Torshizi *et al.*, 2008). Ir ziņots, ka pH vērtības būtiski ietekmē baktēriju dzīvotspēju un žultsskābju klātbūtne vidē ir pat salīdzinoši kaitīgāka (de Angelis & Gobbetti, 2004; Olejnik *et al.*, 2005; Karimi Torshizi *et al.*, 2008). Mūsu pētījumos parādīts, ka *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 dzīvotspēja ir apgriezti proporcionāla ŠVH vērtībām (3.6. – 3.8. attēls) (Shakirova *et al.*, 2013). Savukārt, literatūrā sastopamas norādes par tiešas sakarības iespēju starp PB *Bifidobacterium* spp. ŠVH un kultūru pH noturību (Heller, 2001). Tādejādi mūsu pētījumu rezultāti (3.6. un 3.7. attēls) (Shakirova *et al.*, 2013) apstiprina, ka salīdzinoši hidrofilākām šūnām ir lielākas iespējas izdzīvot nelabvēlīgos ārvides pH apstākļos, turklāt neatkarīgi no baktēriju taksonomiskās piederības, t. i., saglabājoties sakarības raksturam arī Gram-negatīvo baktēriju *Z. mobilis* gadījumā (3.4. un 3.5. attēls) (Shakirova *et al.*, 2008).

Salīdzinot minerālskābes un žultsskābju negatīvo ietekmi uz abu PB celmu dzīvotspēju konstatēts, ka dzīvotspējas samazinājums ir lielāks žultsskābju klātbūtnē, nekā pazemināta pH apstākļos (3.7. un 3.8. attēls) (Shakirova *et al.*, 2013), īpaši hidrofobām šūnām. Tas var norādīt uz žultsskābju destruktīvo iedarbību uz membrānu fosfolipīdiem, tā samazinot šūnu integritāti, jo ir zināms, ka žults sāļu komponentes ietekmē lipīdu emulgatorus un var destabilizēt baktēriju membrānu integritāti (Olejnik *et al.*, 2005).

Žultsskābju sāļi izraisa ŠVH samazināšanos (Kos *et al.*, 2003; de los Reyes-Gavilan *et al.*, 2005) un mūsu pētījumos (Shakirova *et al.*, 2013) ir konstatēts, ka *B. lactis* Bb12 ŠVH samazināšanās pēc inkubācijas minerālskābes (HCl) vai žultsskābju klātbūtnē (Tabula 4) ir atkarīga no ŠVH līmeņa. Ir zināms, ka *Lactobacilli*, reaģējot uz ārvides izmaiņām (piemēram, pH), var pielāgoties un izmainīt savu ŠVH (Majidzadeh Heravi *et al.*, 2011). Izteiktāks ŠVH samazinājums 3% žultsskābes klātbūtnē, īpaši hidrofilām šūnām (Tabula 4), liecina par šūnu tendenci samazināt virsmas hidrofobitāti, tā adaptējoties nelabvēlīgiem ārvides apstākļiem.

Jāatzīmē, ka *L. acidophilus* La5 intracelulāro olbaltumvielu sekrēcijas palielināšanās, kā arī proteolītiskās aktivitātes pieaugums ir tieši atkarīgs no ŠVH pieauguma (3.10. attēls) (Shakirova *et al.*,

2013), un var liecināt par *L. acidophilus* La5 membrānu caurlaidības palielināšanos. Turklāt, *Z. mobilis* gadījumā, palielinoties ŠVH, kopējā olbaltumvielu koncentrācija vidē pieauga (3.11. attēls) (Zikmanis et al., 2007), savukārt, levānsaharāzes sekrēcija samazinājās, kas norāda uz levānsaharāzes un olbaltumvielu sekrēcijas apgriezti proporcionālo saistību. Atšķirībā no levānsaharāzes sekrēcijas *Z. mobilis* šūnās, *L. acidophilus* La5 proteolītiskā aktivitāte pieauga paralēli ar kopējo sekretēto olbaltumvielu daudzumu (3.10. attēls), t. i. līdztekus ar šūnu barjerfunkcijas samazināšanos, ko apstiprina arī šūnu titrēšanas mērījumi (3.11. attēls), izmantojot fluorescento zondi (Tsuchido et al., 1989).

III. Izmantojot analītiskās ķīmijas metodes, *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 un *Z. mobilis* 113S šūnām ar dažādu virsmas hidrofobitāti tika noteikts šūnapvalku makromolekulārais sastāvs. Iegūtās korelācijas starp *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 ŠVH un šūnapvalka pamatkomponentēm (3.12. attēls) (Shakirova et al., 2013) saskan ar ziņām par Gram-pozitīvo baktēriju šūnapvalku hidrofobo raksturu (Ikawa & Snell, 1960; Schar-Zammaretti et al., 2005). Dažos mikroorganismu šūnapvalku pētījumos ir parādīts, ka šūnapvalkos esošie (gliko-)proteīni veido hidrofobāku šūnu virsmu, savukārt, hidrofilas virsmas ir saistītas ar šūnapvalkā esošajiem polisaharīdiem (Kos et al., 2003; Schar-Zammaretti & Ubbink, 2003; Schar-Zammaretti et al., 2005).

Vispārējā gadījumā, *Z. mobilis* ir normāls Gram-negatīvo baktēriju šūnapvalks, kas sastāv no peptidoglikāna slāņa, lipoproteīniem, glikoproteīdiem un LPS slāņa ārējā membrānā (Tornabene et al., 1982; Nikaido, 2003). Novērotās sakarības starp *Z. mobilis* ŠVH un ogļhidrātu, un KDO daudzumu attiecīgajos LPS paraugos, kā arī šūnu virsmas olbaltumvielu daudzumu (3.13. attēls) (Shakirova et al., 2008) apstiprina, ka proteobaktēriju šūnapvalkam ir dominējošs hidrofilis raksturs (Hammarstrom et al., 1971; Osborn et al., 1972; Piater, 2005). Novērotās būtiskās korelācijas norāda, ka abu hidrofilo (ogļhidrāti un LPS) un hidrofobo (virsmas proteīni un lipīdi) šūnapvalku komponentu proporcijas varētu būt atbildīgas par vispārējo baktēriju ŠVH.

Jāatzīmē, ka *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 un *Z. mobilis* 113S intakto šūnu FT-IS spektru sākotnēja analīze parādīja dažas izmaiņas šūnu makromolekulārajā sastāvā atkarībā no ŠVH (Zikmanis et al., 2007; Shakirova et al., 2008; Shakirova et al., 2010). Lai noteiktu šo baktēriju šūnu virsmas bioķīmiskā sastāva izmaiņas atkarībā no ŠVH, ar FT-IS palīdzību tika analizēti baktēriju šūnapvalki (Shakirova et al., 2013). FT-IS šūnapvalku spektri, salīdzinājumā ar intakto šūnu spektriem izrādījās informatīvāki un parādīja būtiskas absorbcijas joslu intensitāšu un viļņu skaitļa variācijas lipīdu ($3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$), olbaltumvielu ($1700 - 1500\text{ cm}^{-1}$) un ogļhidrātu ($1200 - 900\text{ cm}^{-1}$) reģionos atkarībā no baktēriju ŠVH (Tabula 5, 6) (Shakirova et al., 2013).

Ir zināms, ka dažādas strukturālas pārkārtošanās baktēriju šūnapvalkos izraisa izmaiņas H-saišu, lādiņa/dipola, hidrofobās un van der Vālsa mijiedarbībās, kas varētu izpausties kā membrānu barjerfunkciju traucējumi un līdz ar to izraisīt arī vitālo šūnu funkciju traucējumus (Blyholder et al., 1995; Nikaido, 2003). Spektru apgabalā no 3100 cm^{-1} līdz 2800 cm^{-1} dominē absorbcijas līnijas, ko izraisa lipīdu alifātisko ķēžu svārstības (Naumann, 2002; Wang et al., 2010). Asimetrisko un simetrisko metilķēžu svārstības veido absorbcijas joslas ar attiecīgajiem maksimumiem ap 2960 cm^{-1} un 2880 cm^{-1} . Novērotās $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ un $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ svārstību joslu izmaiņas FT-IS spektrā varētu norādīt uz izmainīto orientāciju metilgrupās un alifātisko ķēžu izkārtojumā (Sato et al., 2001), palielinoties *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 un *Z. mobilis* 113S ŠVH vērtībām (Tabula 5). Absorbcijas joslas ar maksimumiem ap 2920 cm^{-1} un 2850 cm^{-1} attiecīgi veidojas no asimetrikām un simetriskām metilēnķēžu ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ un $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$) svārstībām. Šo joslu absorbcijas maksimuma viļņu skaitlis var mainīties atkarībā no konformācijas un temperatūras izraisītām izmaiņām acilķēžu *trans-gauche* konformāciju attiecībās/proporcijās (Naumann, 2002; Kilimann et al., 2006).

IS absorbcijas joslas rajonā no 1740 cm^{-1} līdz 1725 cm^{-1} veidojas no 1,2-diacilglicerolipīda dubultslāņa C–O saites stiepes svārstībām esteros un mainās atkarībā no lipīdu fizikālā stāvokļa (Decca et al., 2007). *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 FT-IS analīze parādīja būtisku šo absorbcijas joslu intensitāšu korelāciju ar ŠVH (Tabula 5).

Amīda I un Amīda II joslas ir galvenās proteīnus identificējošās joslas IS spektrā. Amīda I josla (starp $1700 - 1600\text{ cm}^{-1}$) galvenokārt ir saistīta ar C=O stiepes svārstībām un C–C saišu konformācijām. Amīda II josla (ap 1545 cm^{-1}) veidojas no N–H deformāciju un C–N stiepes

svārstībām. Amīdu joslu viļņu skaits mainās atkarībā no proteīnu ķēžu konformācijām un to savstarpējām proporcijām (Nichols *et al.*, 1985). Piemēram, palielinoties amīda udeņraža saišu daudzumam, Amīda I joslas viļņu skaits samazinās, bet Amīda II joslas - palielinās (Alvarez *et al.*, 1987). Tādējādi, Amīda I un Amīda II joslu viļņu skaitļu vai intensitātes izmaiņas (Tabula 5) varētu attiecīgi norādīt uz olbaltumvielu konformācijas vai koncentrācijas izmaiņām, palielinoties *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 un *Z. mobilis* 113S ŠVH.

IS spektru apgabālā no 1200 cm^{-1} līdz 900 cm^{-1} dominē absorbcijas joslas, ko veido C–O, C–C, C–O–C un C–O–H stiepes svārstības oligo- un polisaharīdos, kas galvenokārt ir pārstāvēti ogļhidrātos (Naumann, 2002). Ogļhidrātu absorbcijas joslu intensitāšu samazināšanās un būtiska viļņu skaitļa nobīde, pieaugot *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 un *Z. mobilis* 113S ŠVH (Tabula 5), liecina par ogļhidrātu daudzuma samazināšanos baktēriju šūnapvalkos (Naumann, 2002; Bosch *et al.*, 2006).

Savukārt, iegūtās daudzfaktoru korelācijas starp *Z. mobilis*, *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 šūnapvalku olbaltumvielu, lipīdu un ogļhidrātu koncentrācijām, FT-IS spektru datiem un ŠVH vērtībām norāda, ka šo baktēriju šūnapvalku bioķīmiskā kompozīcija ir saistīta ar ŠVH un atspoguļo sarežģītas attiecības starp šūnapvalka hidrofilām (ogļhidrāti) un hidrofobām (olbaltumvielas un lipīdi) komponentēm.

Turklāt, līdzīgās *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 olbaltumvielu, lipīdu un ogļhidrātu koncentrācijas, kas iegūtas ar FT-IS spektroskopijas un analītiskās ķīmijas kvantitatīvajām analīzēm (Tabula 7) (Shakirova *et al.*, 2013) liecina, ka FT-IS spektroskopiju var izmantot kā līdzvērtīgu un operatīvu metodi baktēriju šūnu un šūnapvalku kvalitatīvai un kvantitatīvai analīzei.

SECINĀJUMI

1. Daudzfaktoru eksperimentu plānošanas metodes ļauj noskaidrot fizioloģiskos faktorus (oglekļa avoti un to koncentrācijas, temperatūra, augšanas fāze, skābekļa un membranotropono savienojumu klātbūtne), kuru izmaiņas un mijiedarbība modificē etanolveidojošo (*Z. mobilis* 113S) un probiotisko (*L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12) baktēriju šūnu virsmas hidrofobitāti.
2. Dažādi oglekļa avoti atšķirīgi ietekmē probiotisko un etanolveidojošo baktēriju šūnu virsmas hidrofobitāti. *L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12 šūnu virsmas hidrofobitāti būtiski palielina laktozes klātbūtne vidē, bet *Z. mobilis* 113S šūnām – saharozes klātbūtne.
3. Etanolveidojošo (*Z. mobilis* 113S) un probiotisko baktēriju (*L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12) šūnu virsmas hidrofobitāti var palielināt, palielinot oglekļa avota koncentrāciju. *L. acidophilus* La5 šūnu virsmas hidrofobitāte būtiski palielinās, pieaugot fruktozes polimēra (levāna) koncentrācijai un nav atkarīga no vides kopējās osmolaritātes.
4. Ir apstiprināta apgriezti proporcionāla sakarība starp etanolveidojošo un probiotisko kultūru virsmas hidrofobitāti un šūnu dzīvotspēju pēc kriokonservācijas, glabāšanas un nelabvēlīgu ārvides faktoru (minerālskābes, žultsskābju, etanola) iedarbības. Pazemināta ārvides pH un žultsskābju iedarbības apstākļos probiotisko pienskābes baktēriju kultūrai *L. acidophilus* La5 ir augstāka noturība nekā *B. lactis* Bb12.
5. Kultivācijas apstākļi, kas nodrošina etanolveidojošo (*Z. mobilis* 113S) un probiotisko baktēriju (*L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12) virsmas hidrofobitāti, attiecīgi, 15% – 25% un 35% – 50% robežās, sekmē paaugstinātu šūnu dzīvotspēju nelabvēlīgos ārvides apstākļos.
6. Ir apstiprināta tieša lineāra sakarība starp probiotiskās kultūras *L. acidophilus* La5 šūnu virsmas hidrofobitāti un proteolītisko fermentu aktivitāti, un apgriezta lineāra sakarība starp *Z. mobilis* 113S levānsaharāzes sekrēciju un šūnu virsmas hidrofobitāti.
7. FT-IS spektra lipīdus un ogļhidrātus identificējošo absorbcijas joslu viļņu skaitļa un intensitātes izmaiņas liecina par Gram-negatīvo baktēriju virsmas hidrofobitātes atšķirībām, bet par Gram-pozitīvo baktēriju šūnu virsmas hidrofobitātes atšķirībām arī olbaltumvielu un esteru joslu raksturlielumi.

AIZSTĀVĒŠANAI IZVIRZĪTĀS TĒZES

1. Kultivāciju apstākļu izmaiņas (oglekļa avoti un to koncentrācijas, temperatūra, augšanas fāze, skābekļa klātbūtne, membranotropono savienojumu klātbūtne) ļauj virzīti ietekmēt etanolveidojošo (*Z. mobilis* 113S) un probiotisko baktēriju (*L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12) virsmas īpašības (šūnu virsmas hidrofobitāte, membrānu caurlaidība, šūnu adhēzija) neatkarīgi no organisma taksonomiskās piederības.
2. Etanolveidojošo (*Z. mobilis* 113S) un probiotisko (*L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12) baktēriju fizioloģiskā noturība nelabvēlīgu ārvides faktoru iedarbībā (sasaldēšana/ atkausēšana; liofilizācija/rehidratācija; kriokonservācija; minerālskābes un žultsskābju klātbūtne) ir apgriezti proporcionāla baktēriju šūnu virsmas hidrofobitātei.
3. Etanolveidojošās un probiotisko baktēriju hidrolītisko fermentu sekrēcija vidē ir korelatīvi saistīta ar šūnu virsmas hidrofobitāti. *L. acidophilus* La5 proteolītisko fermentu aktivitāte pieaug, palielinoties šūnu virsmas hidrofobitātei savukārt *Z. mobilis* 113S levānsaharāzes sekrēcija vidē samazinās līdz ar šūnu virsmas hidrofobitātes palielināšanos.
4. Etanolveidojošo (*Z. mobilis* 113S) un probiotisko (*L. acidophilus* La5 un *B. lactis* Bb12) baktēriju šūnu virsmas hidrofobitātes izmaiņas ir saistītas ar šūnapvalka bioķīmisko sastāvu (olbaltumvielas/lipīdi/ogļhidrāti), ko var kontrolēt pēc konkrētu absorbcijas joslu intensitātes un viļņu skaitļa izmaiņām FT-IS spektros. Par virsmas hidrofobitātes atšķirībām Gram-negatīvo baktēriju spektros liecina lipīdu un ogļhidrātu absorbcijas joslu viļņu skaitļa un intensitātes izmaiņas, bet Gram-pozitīvo baktēriju spektros būtiski ir arī olbaltumvielu un esteru joslu raksturlielumi.

UNIVERSITY OF LATVIA
FACULTY OF BIOLOGY

LAISANA SHAKIROVA

**INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS
ON THE CELL SURFACE PROPERTIES AND PHYSIOLOGICAL
RESISTANCE OF ETHANOLOGENIC
AND LACTIC ACID BACTERIA**

Summary of Doctoral Thesis

Submitted for the degree of Doctor of Biology
Subfield of Microbiology

Riga, 2013

The doctoral thesis was carried out:

at the Institute of Microbiology and Biotechnology, the University of Latvia (LU MBI)

from 2008 to 2012.



Eiropas Sociālā fonda projekts „Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē” Nr.2009/0138/ 1DP/1.1.2.1.2./ 09/IPIA/ VIAA/004.

The thesis contains the introduction, review of literature, materials and methods, results and discussion chapters, conclusions, theses for defence and reference list.

Form of the thesis: collection of research papers in biology, microbiology subfield

Supervisor: Pēteris Zikmanis, *Dr. habil. biol.*, senior researcher (Institute of Microbiology and biotechnology, University of Latvia, Riga, Latvia;

Māra Grūbe, *Dr. biol.*, senior researcher (Institute of Microbiology and biotechnology, University of Latvia, Riga, Latvia.

Reviewers:

- 1) Prof., *Dr. habil. biol.* Indriķis Muižnieks (University of Latvia, Faculty of Biology);
- 2) *Dr. habil. biol.* Aleksandrs Rapoportš (Institute of Microbiology and biotechnology, University of Latvia);
- 3) *Dr. habil. phys.* Larisa Grigorjeva (Institute of Solid state Physics, University of Latvia).

The thesis will be defended at the public session of the Doctoral Committee of Biology, University of Latvia, at 15.30 on the 10th of May, 2013, at the Faculty of Biology, University of Latvia, Kronvalda Blvd 4, Riga, Latvia.

The thesis is available at the Library of the University of Latvia, Kalpaka blvd. 4.

This thesis is accepted for the commencement of the degree of Doctor of Biology on, 2013 by the Doctoral Committee of Biology, University of Latvia.

Chairman of the Doctoral Committee

_____/ Uldis Kalnenieks/
(paraksts)

Secretary of the Doctoral Committee

_____/ Daina Eze/
(paraksts)

© University of Latvia, 2013
© *Laisana Shakirova*, 2013

ABSTRACT

Interactions of microorganisms with their environment are of major importance during the life cycle like growth, cell division, protection against the environment and infection of a host. The cell surface properties basically determine the character of interactions including the exchange of nutrients and waste products, the resistance to external stresses (mechanical, chemical, thermal, and osmotic). The cell surface properties substantially influence the interactions between microorganisms and their relationships with the hosts.

The major characteristics of bacterial cell surface include the cell surface hydrophobicity (CSH), which generally reflects the proportion between hydrophilic and hydrophobic components of the cell envelope: the overall electric properties (charge) of the cell and the structural organization of bacterial surface. Changes of environmental parameters (cultivation conditions, the presence of various agents, etc.) cause a variety of responses including changes of the cell surface properties, which, in turn, can be controlled by accordingly modified environmental conditions.

The Promotion work deals with the comparison of combined effects of cultivation conditions on the growth of ethanologenic bacteria *Zymomonas mobilis* 113S and probiotic bacteria (*Lacidophilus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb12) and the resistance of cells under adverse environments, in connection with relevant (physiology & technology) properties of cell surfaces, especially in single cell cultures of probiotic and ethanologenic bacteria, using methods of factorial design and multivariate analysis. Protein secretion in bacteria with different cell surface hydrophobicity and chemical composition of ethanologenic and probiotic bacteria cell walls were examined using FT-IR spectroscopy and analytical chemistry methods.

An estimation of the course of changes within the structural and functional properties of *Z. mobilis* and probiotic bacteria *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 will help to control, predict and realize a goal-directed influence on the growth, development and stability of single strain cultures and probiotic bacteria starters.

The main results of the promotion work are summarized and published in six research papers (2005 – 2012) in international peer-reviewed journals. The results of the studies have been presented in six international conferences. The promotion research was carried out at the Institute of Microbiology and Biotechnology, the University of Latvia (LUMBI).

CONTENTS

Abstract	37
Contents	38
Abbreviations	39
Topicality and general description of the research	40
Approval of the promotion research	43
Bacterial cell walls and surfaces: structural features and functional properties	45
Materials and methods	49
An outline of the results	52
Discussion	63
Conclusions	67
Theses for Defence.....	68
Literatūra/References	69

ABBREVIATIONS

LAB – lactic acid bacteria
CSH – cell surface hydrophobicity
LPS – lipopolysaccharides
GIT – gastrointestinal tract
FT-IR – Fourier transform infrared
FOS – fructooligosaccharides
KDO – ketodeoxyoctulonic acid
CFU – colony-forming units
S.E. – standard error
n.d. – not detected
EPS – exopolysaccharides
MRS – *Lactobacillus* medium in accordance with De Man, Rogosa and Sharpe (De Man et al., 1960)
MATH – microbial adherence to hydrocarbon
SAT – salt aggregation test
PNA – 1-*N*-Phenylnaphthylamine
A.U. – arbitrary units

TOPICALITY AND GENERAL DESCRIPTION OF THE RESEARCH

Interactions of microorganisms with their environment are of major importance during the life cycle of a microorganism (cell division, growth, development). The surface properties of a microorganism are determinants of these interactions including the exchange of nutrients and waste products, the resistance to external stresses (mechanical, chemical, thermal, and osmotic) (Schar-Zammaretti & Ubbink, 2003). The surface properties also influence the interactions between microorganisms and their relationships with the hosts. Main characteristics of the bacteria cell surface are the cell surface hydrophobicity (CSH), which generally reflects the proportion between hydrophilic and hydrophobic components, cell electric properties (charge) and cell surface structural organization (Geertsema-Doornbusch *et al.*, 1993). The cell surface properties of Gram-positive bacteria are determined by the surface-linked extracellular polysaccharides and surface proteins (S-proteins) (Delcour *et al.*, 1999). In turn, in hydrophilic cell surface of proteobacteria *Z. mobilis* dominate lipopolysaccharides (LPS), whereas in hydrophobic cells the amount of hydrophobic surface proteins increases alongside with an increase of CSH (Shakirova *et al.*, 2008). Still a number of open questions remain including the structural organization of the cell wall, the chemical properties of the surface constituents and the conformational impact of the surface macromolecules.

The chosen model organisms of this study were the ethanologenic Gram-negative bacteria *Zymomonas mobilis* 113S that exhibit strong biosynthetic potential in regard to various metabolites (levan, fructose oligosaccharides, sorbitol etc.), and single cell cultures of lactic acid bacteria (LAB) *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12, that are yogurt-forming ATB type starter components and synthesize fructan-containing exopolysaccharides (EPS).

A large number of LAB have probiotic properties, because they improve human health, form conditions for elimination of pathogenic microorganisms from gastrointestinal tract (GIT), and build on the organism's immune system (Guarner & Schaafsma, 1998; Ouwehand *et al.*, 2002; Tannock, 2002). On the other hand, the growth of probiotic cultures are promoted by indigestible carbohydrates (prebiotics), such as fructooligosaccharides (FOS) and levan synthesized by *Z. mobilis* (Semjonovs *et al.*, 2008). The main and decisive factor for efficient manifestation of LAB functions is the resistance to hydrochloric acid of gastric juice, bile acids and digestive enzymes, to achieve and colonize (adherence to epithelial cells) GIT in sufficient quantity and viable state (Ouwehand *et al.*, 2002). Moreover, probiotics should also survive after industrial processing (freezing, freeze-drying etc.), either during the storage of product (van de Guchte *et al.*, 2002). Viability of probiotics in food products could depend on pH, storage temperature, oxygen level, competing microorganisms and presence of inhibitors (Carvalho *et al.*, 2004).

Changes of the external environment parameters provoke various cell responses that are reflected as changes of cell surface properties (Schar-Zammaretti & Ubbink, 2003). We have shown that CSH of *Z. mobilis* could be affected by modified growth conditions (elevating or decreasing the cultivation temperature, the carbon source or its concentrations, exogenously added membranotropic compounds) (Zikmanis *et al.*, 2007). These agents (detergents, higher alcohols, etc.) affect the functions of membrane and, particularly, the hydrophobic parts of the cell (Zikmanis *et al.*, 2005). Our studies have confirmed that the CSH of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 can be modulated by changing the growth conditions (carbon source and its concentration, growth phase, presence of oxygen), but the effects are different in comparison with bacteria *Z. mobilis*. It was shown that fructan polymer levan promotes the increase of CSH, as well as the growth of LAB (Shakirova *et al.*, 2013). We have found that the survival of *Z. mobilis* (Shakirova *et al.*, 2008), as well as *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 (Shakirova *et al.*, 2013) during the freezing/thawing and freeze-drying processes depends on the CSH. These studies indicated the possible protective effect of sorbitol and trehalose on bacteria subjected to freeze-drying. Thus there is a reason to suppose that protective substances can differently affect the hydrophilic and hydrophobic cells.

Heller (Heller, 2001) reported the direct relationship between CSH and pH tolerance of LAB *Bifidobacterium spp.* culture. The results of our studies on individual cultures lead to the opposite conclusion, as *L. acidophilus* La5 with different CSH of relatively hydrophilic cells were more pH-tolerant, as well as, in general the hydrophobic *B. lactis* Bb12 (Shakirova *et al.*, 2012).

Several papers report the LAB resistance to stress factors, the influence of external environment on the surface properties, and its expression on the ensuring of probiotic efficiency (Gobetti *et al.*, 2000; Vinderola *et al.*, 2002). Nevertheless that it is approved that these processes are dependent on many factors, still the simultaneous interaction effects of these factors is not sufficiently studied. To evaluate these combined interactions it is necessary to apply the methods of factorial design and multivariate analysis, as the methodological base of theses.

Therefore, **the aim of the promotion work** was to evaluate the complex effects of various environmental factors on the physiologically and technologically relevant cell surface properties of ethanologenic (*Zymomonas mobilis*) and probiotic (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) bacteria by methods of factorial design and multivariate analysis.

Following **tasks** were formulated to attain the aim of the promotion study:

8. To estimate the influence of cultivation conditions (carbon sources and its concentrations, temperature, growth phase, presence of oxygen and membranotropic compounds) on the surface properties of ethanologenic and probiotic bacteria.

9. To evaluate the physiological resistance of bacteria under adverse environments (ethanol; mineral acid; bile acids; freezing/thawing; freeze-drying/rehydration; cryoconservation) individually and in combination with other factors.

10. To assess comparatively the cell barrier function and secretion of hydrolytic enzymes in bacteria with different cell surface hydrophobicity.

11. To specify the biochemical composition of bacterial cell envelopes (proteins/lipids/carbohydrates) of varied hydrophobicity and evaluate its properties (aliphatic chain and protein conformation characteristics, components esterification level, etc.) by FT-IR spectra absorption band position and intensity changes.

The scientific novelty and significance of promotion study:

1. For the first time from a single view the influence of cultivation conditions (carbon sources and its concentrations, temperature, growth phase, presence of oxygen and membranotropic compounds) on the ethanologenic and probiotic bacteria surface properties have been comparatively assessed.

2. The physiological resistance of bacteria under adverse environments (ethanol; mineral acid; bile acids; freezing/thawing; freeze-drying/rehydration; cryoconservation) individually and in combination was mutually compared.

3. Novel approaches for modification of ethanologenic and probiotic bacteria surface properties were proposed, which allow to increase the cell survival under adverse external environment conditions.

4. The changes of cell barrier function and secretion of hydrolytic enzymes in bacteria with different cell surface hydrophobicity were comparatively evaluated.

5. The biochemical composition of Gram-negative and Gram-positive bacteria cell walls has been characterized and compared, and its spectral properties by FT-IR absorption band position and intensity changes evaluated.

6. The facilities of FT-IR spectroscopy for qualitative and quantitative analyses of bacteria cells and cell envelopes were approved and comparatively evaluated.

The results of promotion paper expands the knowledge on the relationship between cell wall structures and the cell surface hydrophobicity of ethanologenic and probiotic bacteria (LAB) and its dependence on complex changes of cultivation conditions and the determinants of cell physiological resistance under adverse external conditions. Estimation of direction and nature of bacterial surface property changes enables to control, predict and affect in the preferred way the cell growth and

development as well as physiological resistance that are required to ensure the technological stability of fermentation products, including the probiotic potential of LAB.

Support of the promotion research has been granted within the ESF project ESS2009/77 «Support for Doctoral Studies at University of Latvia» (contract No. 2009/0138/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/ VIAA/004).

APPROVAL OF THE PROMOTION RESEARCH

The results of the promotion research have been reported at six international conferences in France, German, Italy, Slovakia and Switzerland.

1. Semjonovs P., Shakirova L., Grube M., Auzina L., Zikmanis P., Levan promotes the hydrophobicity and biomass productivity of probiotic bacteria in lactose containing media. – 13th World Congress of Food Science & Technology – FOOD IS LIFE; 2006, Nantes, France, September 17-21st (poster presentation).
2. Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Grube M., Influence of environmental conditions on hydrophobicity of *Zymomonas mobilis* 113S cells and characteristics of FT-IR spectra, 4th International Conference Shedding Light on disease: Optical Diagnosis for the New Millenium; 2006, Heidelberg, Germany, May 21-24th (poster presentation).
3. Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Grube M., Relationship between the cell surface hydrophobicity and ethanol tolerance of bacteria *Zymomonas mobilis*, 6th Workshop, FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics; 2007, Robert Koch-Institute, Berlin, Germany, October 25-26th (poster presentation).
4. Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Gavare M., Grube M., Influence of growth conditions on hydrophobicity of *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cells and characteristics of FT-IR spectra, 13th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules; 2009, Italy, Palermo, August 28th - September 2nd (poster presentation).
5. Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Gavare M., Grube M., Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of probiotic lactic acid bacteria under adverse environmental conditions, International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics - IPC 2010; 2010, Kosice, Slovakia, June 15-17th (poster presentation).
6. Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Gavare M., Grube M., Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 bacteria under adverse environmental conditions and characteristics of FT-IR spectra, 4th Congress of the European Microbiologists FEMS 2011; 2011, Geneva, Switzerland, June 26-30th (poster presentation).

The results of the promotion research are summarized and published in six research papers in international peer-reviewed journals in the field of the present study.

1. Zikmanis P., Shakirova L., Baltkalne M., Andersone I., Auzina L., The effect of amphiphilic compounds on the secretion of levansucrase by *Zymomonas mobilis*. – Process of Biochemistry, 2005, 40: 3723-3731.
2. Zikmanis P., Shakirova L., Auzina L., Andersone I., Hydrophobic properties of bacteria *Zymomonas mobilis* under varied environmental conditions. – Process of Biochemistry, 2007, 42: 745-750.
3. Shakirova L., Auzina L., Grube M., Zikmanis P., Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of bacteria *Zymomonas mobilis* after exposures to ethanol, freezing or freeze-drying. – Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35: 1175-1180.
4. Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Gavare M., Grube M., Influence of growth conditions on hydrophobicity of *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cells and characteristics of FT-IR spectra. – Spectroscopy, 2010, 24: 251-255; DOI 10.3233/SPE-2010-0470 (IOS-Press, NL).
5. Shakirova L., Grube M., Goodacre R., Gavare M., Auzina L., Zikmanis P., FT-IR spectroscopic studies of cell envelopes from bacteria *Zymomonas mobilis* of varied surface hydrophobicity. – Vibrational Spectroscopy, 2013, 64: 51-57; DOI: 10.1016/j.vibspec.2012.10.008
6. Shakirova L., Grube M., Gavare M., Auzina L., Zikmanis P., Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* La5 and

Bifidobacterium lactis Bb12 and characteristics of FT-IR spectra. – Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40: 85-93; DOI: 10.1007/s10295-012-1204-z.

The doctoral thesis is a collection of published research papers (2008 – 2012). The promotion research has been performed at the Institute of Microbiology and Biotechnology, the University of Latvia (LU MBI).

BACTERIAL CELL WALLS AND SURFACES: STRUCTURAL FEATURES AND FUNCTIONAL PROPERTIES

Interactions of microorganisms with their environment are of major importance in many phases of the life cycle, like growth, cell division, protection against a hostile environment, and the infection of a host. The surface properties of microorganisms largely determine the exchange of nutrients and waste products and the resistance of cells to external stresses (mechanical, chemical, thermal, and osmotic) (Schar-Zammaretti & Ubbink, 2003). The surface properties also substantially influence the interactions between microorganisms and their relationships with the hosts. Interactions of microorganisms can be specific or nonspecific. Specific interactions generally involve the interactions of complementary bonds that form microbial cell surface and the surface on which microorganisms are able to colonize and which have higher mutual affinity (Savage & Fletcher, 1985). Whereas nonspecific interactions are governed by the overall physicochemical properties of the bacterial cell wall including electrostatic and hydrophobic interactions (Sweet *et al.*, 1987).

For a long time, it has been recognized that important aspects of microbial behavior are controlled by the physicochemical properties of the cell wall (Webster, 1925; Marshall, 1976; Wadström, 1990). However, detailed analyses of the relation between cell-wall structure and its physicochemical properties are only gradually emerging (however) (Boulbitch *et al.*, 2000; Busscher *et al.*, 2000). In order to characterize cell surface interactions of microorganisms the overall electric properties, mostly the z-potential, and the hydrophobicity of the surface are usually analyzed (Schar-Zammaretti & Ubbink, 2003). Knowledge of these two surface properties is used to correlate or simulate the interactions of the bacterial cell wall with external surfaces or hosts. The CSH has been acknowledged as a physical measurable macroscopic characteristic of bacteria which generally reflects the proportion between hydrophilic and hydrophobic components of the cell envelope (Geertsema-Doornbusch *et al.*, 1993). CSH responds to a wide variety of environmental factors and, in turn, appears to be involved in cell-to-cell interaction, adherence of bacteria to solid surfaces and host tissue, resistance of cells to adverse environmental conditions etc. (Rosenberg *et al.*, 1980; Rosenberg & Doyle, 1990; Vanhaecke *et al.*, 1990).

Gram-positive microorganisms well serve as model systems to study the structure-property relations of the bacterial cell wall, as they have the relatively simple cell-wall (Delcour *et al.*, 1999). Moreover, these bacteria are nonmotile and a large number of microbiologically and genetically well-characterized strains are available. The Gram-positive cell wall of bacteria (Fig. 1.1.) consists mainly of peptidoglycans, (lipo) teichoic acids, (surface) proteins and polysaccharides (Delcour *et al.*, 1999). Gram-negative bacteria (Fig. 1.1.) differ by the fact that over the peptidoglycan layer also the outer membrane is localised (Sikkema *et al.*, 1995). Within its composition proteins are embedded in the bilayer composed of phospholipids and LPS molecules. In the inner part of the outer membrane occur lipoprotein complexes that bind the outer membrane with the glycopeptide layer (Madigan *et al.*, 2000). LPS play an important role in the regulation of envelope permeability of Gram-negative bacteria, ensuring a relatively hydrophilic cell surface (Nikaido & Vaara, 1985). The outer membrane sufficiently protects *E. coli* cells from most of hydrophobic antibiotics. Only disruption of the outer membrane structure, for example by rhamnolipid (Al-Tahhan *et al.*, 2000), the membrane permeability can be increased in regard to hydrophobic molecules and ions (Lieve, 1974).

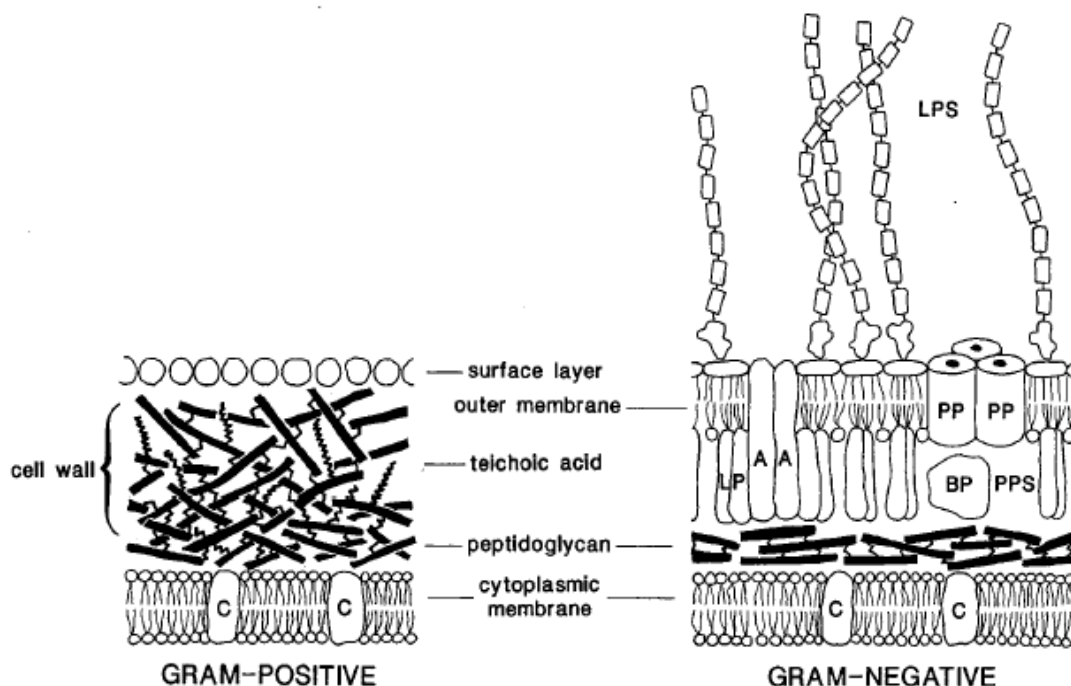


Fig. 1.1. Schematic image of the cell envelope of Gram - positive and Gram - negative bacteria. PP - porin; C - cytoplasmic membrane-embedded protein; BP - binding protein; PPS - periplasmic space; A - outer membrane protein; LP - lipoprotein. (Sikkema *et al.*, 1995).

LAB are a group of taxonomically diverse, Gram-positive bacteria that are able to convert fermentable carbohydrates mainly into lactic acid, acidifying the growth medium in the process. In general, LAB species are best known for their use in the food industry, mainly involved in the preparation of fermented dairy products (cheese, yoghurt, sour cream etc.) and their importance is well recognized worldwide. Over the past decades, interest in LAB has dramatically increased, particularly by the widely recognized fact that selected LAB strains can influence the intestinal physiology (Corveleyn *et al.*, 2012).

Microorganisms of the genus *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are considered as “classic” probiotics and are widely used as active ingredients in functional dairy-based products and other foods. Probiotics are defined as “living microorganisms, which upon ingestion in certain numbers exert health benefits beyond inherent basic nutrition” (Guarner & Schaafsma, 1998; Tannock, 2002). Their health-promoting effects include the inhibition of pathogens, antimutagenic and anticarcinogenic activity, prevention of diarrhoea, stimulation of the immune response, a reduction of serum cholesterol levels etc. (Ouwehand *et al.*, 2002). However, characteristics ascribed to a probiotic strain are in general strain specific, and individual strains have to be tested for each property (Ljungh & Wadström, 2006).

In order to achieve and colonize (adherence to epithelial cells) the GIT and successfully perform their functions, LAB strains must overcome the biological barriers that include the presence of acid in the stomach, bile in the intestine and digestive enzymes (Ouwehand *et al.*, 2002), together with non-optimal growth temperatures, and growth-inhibitory compounds such as fatty acids and tannins, originated from yeast and bacteria metabolism (Kumar *et al.*, 2011). Bile salts are synthesized in the liver from cholesterol and secreted into the duodenum to facilitate fat absorption. Since these compounds are toxic for bacterial cells, the gastrointestinal microbiota must develop strategies to defend themselves against bile (de los Reyes-Gavilan *et al.*, 2005), although the cellular mechanisms of resistance to bile salts still remain poorly understood. The adaptation of probiotic bacteria to bile salts might be a valuable tool for increasing the survival of these microorganisms in the GIT.

Some dietary carbohydrates indigestible in the upper GIT can act as substrates for bacterial fermentation. These carbohydrates, generally known as prebiotics, are assimilated by probiotic microorganisms thus promoting their proliferation in the gut and exerting health benefits in the host (de los Reyes-Gavilan *et al.*, 2005).

Fructan-containing prebiotics, such as levan (β -2,6-polyfructan) and FOS can be synthesized by ethanologenic Gram-negative *Zymomonas mobilis*. These bacteria exhibit a strong biosynthetic potential in regard to various metabolites (ethanol, levan, fructose oligosaccharides, sorbitol, gluconic acid) which makes them attractive for technological applications (Montenecourt, 1985; Doelle *et al.*, 1993; Gunasekaran & Chandra Raj, 1999). Besides, the native fermentation capacities of proteobacteria *Z. mobilis* can be further improved by various physiological, genetic and engineering approaches with a special reference to the broadening of substrate and product spectra by an introduction and expression of appropriate foreign genes (Montenecourt, 1985; Doelle *et al.*, 1993; Gunasekaran & Chandra Raj, 1999).

Any bacterial culture selected for industrial purposes, should also tolerate the adverse conditions encountered in industrial processes (freezing, freeze-drying etc.), either during starter handling and storage (van de Guchte *et al.*, 2002). Moreover, survival of probiotics in food products could depend on pH, storage temperature, oxygen level, high concentration of NaCl or ethanol, competing microorganisms and presence of inhibitors (Carvalho *et al.*, 2004). At industrial settings, probiotics may be preserved and distributed in liquid, dried, frozen or lyophilized (freeze-dried) forms. While all these preparations can be suitable for use as starter cultures in food industry, emphasis is increasingly being placed on long-term preservation methods that promote high cell viability and metabolic activity, as these parameters are considered a prerequisite for (bio)medical applications (Carvalho *et al.*, 2004; Corveleyn *et al.*, 2012).

It is known that a wide variety of external environmental factors can essentially affect the stability of cell surface (Das & Kapoor, 2004). Thus, physical factors (temperature, light, electric fields, pressure, pH, etc.) change the composition and functions of cell surface and membrane (Denich *et al.*, 2003). Induced by external environment cells can develop outer cell wall layer, which is more adapted to various specific conditions and the cell surface hydrophobic properties can be changed (Sikkema *et al.*, 1995). Surface properties of microorganisms also depend on the growth temperature and medium composition. It was reported that the growth temperature essentially influences the membrane composition of *Z. mobilis*, as with the increase of temperature the ratio of fatty acids to phospholipids in membrane is changed (Benschoter & Ingram, 1986). During cultivation of *Listeria monocytogenes* at different temperatures, it was shown that the cell adhesion to stainless steel, as well as CSH increased with the increase of the growth temperature (Briandet *et al.*, 1999). It is known that sucrose, in comparison with glucose or mannose, significantly increases the CSH of *Pseudomonas fluorescens* (McEldowney & Fletcher, 1985). However, still there are no sufficient data concerning the relevance between the cultivation conditions and the surface properties of bacteria, as well as their influence on the bacterial interactions (Schär-Zammaretti *et al.*, 2005).

Moreover, the properties of cell surface and membrane can be affected by a wide variety of chemicals (Nikaido & Varra, 1985). For instance, even small concentration of rhamnolipid can cause partial avulsion of LPS from outer membrane, and thereby significantly increase the CSH (Al-Tahhan *et al.*, 2000). Surfactants that represent a heterogeneous class of surface active compounds can affect the membranes, changing the lipid/protein interaction (Sikkema *et al.*, 1995). Organic solvents can cause the loss of lipids and proteins in cell membrane, inhibition of membrane protein functions, as well as reduce other vitally important functions (Segura *et al.*, 1999).

The toxic nature of alcohols affects the hydrophobic parts of the cell, most likely the plasma membrane. Sikkema (Sikkema *et al.*, 1995) reported that ethanol and bio-membrane interaction results in a reduced membrane integrity. It was also shown that aliphatic alcohols cause the phase transition temperature shift in model-membrane (Eliasz *et al.*, 1976). Moreover, the toxicity level of alcohols appears as directly proportional to its carbon chain length (Sikkema *et al.*, 1995). Our studies also showed that amphiphilic compounds (aliphatic and aromatic alcohols, procaine and surfactants) can affect the membrane properties of *Z. mobilis* (Zikmanis *et al.*, 2005).

In addition to conventional biochemical methods of analysis information on the chemical composition of the outer layers of microbial cell wall can be obtained by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Infrared spectroscopy is a non-destructive technique which allows to obtain information on the overall chemical composition of a sample including bio-samples (Bosch *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006; Pistorius *et al.*, 2009). This technique is also successfully used for

characterization and identification biological samples/strains (Naumann, 2002; Huang *et al.*, 2006; Grube *et al.*, 2012), as well as for fermentation process and product monitoring (Grube *et al.*, 2002; Mazarevica *et al.*, 2004). It is known, that the structural organization of the various constituents within the cell wall is reflected in the bacterial surface properties, as well as organism's physiological state, reflecting the influence of cultivation conditions on the cell regulatory mechanisms (Pistorius *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

How the structural organization of the cell wall, the chemical properties of the surface constituents and, in particular, the conformation of the surface macromolecules determine the physicochemical properties of the cell wall still remain as largely open questions.

Therefore, deeper understanding of the factors influencing the surface properties of probiotic bacteria will definitely promote the selection and evaluation of strains with the desired characteristics for food processing and health benefits.

MATERIALS AND METHODS

Strains and cultivation

Zymomonas mobilis strain 113S and 29191 (Microbial Strain Collection of Latvia) was maintained and cultivated batchwise without aeration in the medium consisting of (g/l⁻¹) KH₂PO₄, 2.5; (NH₄)₂SO₄, 1.6; MgSO₄·7H₂O, 1.0; yeast extract (*Sigma*), 5.0 and an appropriate carbon source (glucose or sucrose) at the range of concentration 0.14 - 1.11M, pH 5.5. *Z. mobilis* was grown at different temperatures (25, 30 and 37°C) with or without n-alkanols (butanol, pentanol, heptanol, octanol, tetradecanol, hexadecanol) concentrations of 0.04 - 1mM, or surfactants (Tween20, Tween80) at concentrations of 0.049 and 0.046mM, respectively.

Lactobacillus acidophilus La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 (Chr. Hansen Appl. Technol. Lab., Denmark) were grown under aerobic or anaerobic (BBL Gas Pak 150™ System, USA) conditions, at 37°C, in the MRS medium consisting of (g/l⁻¹) peptone, 10.0; beef extract, 8.0; sodium acetate, 5.0; yeast extract (*Sigma*), 4.0; ammonium citrate, 2.0; KH₂PO₄, 2.0; Tween 80, 1.0; MgSO₄·7H₂O, 0.1; MnSO₄·5H₂O, 0.05 and an appropriate carbon source (glucose, sucrose or lactose) concentrations of 2% - 5%, pH 6.5 for 18 or 48 h.

Preparation of cells and measurements of CSH

The cells harvested at appropriate growth phase were separated by centrifugation (5000×g, 10 min, 20°C), washed twice with 50mM phosphate buffer (pH 7.1), resuspended in the same buffer to reach the standardized concentration of cells (OD₆₆₀ = 0.5) and the cell surface hydrophobicity (CSH) measured by modified MATH (Microbial Adherence to Hydrocarbon) method (Aono & Kobayashi, 1997) using o-xylene (*Sigma*) and the results were expressed as percentage reductions in absorbancy of the test suspensions (with o-xylene) as compared to the control suspensions (without o-xylene).

The salt aggregation test (SAT) was performed in accordance with the standard procedure (Lindahl *et al.*, 1981) to estimate the hydrophobicity of cell surface, i.e., the lowest (NH₄)₂SO₄ concentration causing bacterial aggregation. All readings of bacterial aggregation were compared with the reaction at the highest molarity of the salt (positive control). Bacterial suspension (5 · 10⁹ cells/ml) with 2mM sodium phosphate, pH 6.8 without addition of salt were used as a negative control (Lindahl *et al.*, 1981).

Preparation of cells and incubation conditions

Cells from the late logarithmic growth phase ($\mu = 0.150 - 0.20 \text{ h}^{-1}$) were separated by centrifugation (5000×g, 15 min, 20°C) and washed twice with 50mM Tris/malate buffer (pH 5.3). Cells were incubated in the same buffer with sucrose (10mM), cells (2.0 – 2.5 mg dry biomass/ml) (controls) and with compounds (aliphatic alcohols (1-butanol up to 1-hexadecanol) or Tweens), under study (0.04 – 1mM) for 0.5h at 30°C. Cells were separated by centrifugation (7000×g, 10 min) and supernatant stored on ice for subsequent assays.

Freezing-thawing, long-term storage procedures and freeze-drying of cells

Five or 10 ml of cell water suspension (8 · 10¹⁰ cells/ml) were frozen at -20°C and subsequently thawed at 30°C, 0.5h or stored at -20°C for 6 months. Frozen suspensions of cells were lyophilized by a lab-scale freeze-dryer (LGA 05, VEB MLW, Leipzig, Germany) at constant temperature of -20°C and vacuum pressure of 0.4 Pa for 16h. Vials of freeze-dried cells were stored in desiccator over silicagel, at 4°C for 5 – 7 days. Rehydration of freeze-dried cells was performed at 30°C for 0.5h using the same volume of sterile water as for initial suspensions. The viability of cells after freezing, freeze-drying or long-term storage were examined using standard serial dilution method and subsequent plating in triplicate onto the agar medium, and incubation of *Z. mobilis* at 30°C for 48 – 72h or onto the MRS agar and incubation of *L. acidophilus* and *B. lactis* at 37°C for 48 – 72h.

Cell low pH and bile acid tolerance measurements

The cells from a stationary phase of growth were recovered by centrifugation (7000×g, 10 min, 20°C), resuspended in an equal volume of MRS broth (devoid of yeast extract, pH 5.5) (cell concentration at OD₆₆₀ = 0.5) and adapted for 30 min at 30°C. Cell tolerance measurements under low pH and bile acid conditions were performed in accordance with the protocol (Shalini & Hariom 2009). Bacterial counts were expressed as the log number of colony forming units (log CFU/ml). The effects of stress exposure were determined as the log reduction (Δ log CFU) between the control sample and the test sample and compared according to the expression Δ log CFU = log control (CFU/ml) - log test sample (CFU/ml).

Extraction of cell envelopes

The cell water suspension was sonicated for 20 min at 0.5 kHz in ice-water bath. Unbroken cells were removed by centrifugation (6000×g, 10 min, 4°C). Envelopes of *Z. mobilis* were pelleted by centrifugation at 100000×g, 60 min, 4°C (Ikawa & Snell, 1960) and of *L. acidophilus* and *B. lactis* by centrifugation at 25000×g, 25 min, 4°C (Aono & Kobayashi, 1997), washed once with phosphate buffer and stored at -20°C. The quality of cell envelopes was monitored by fluorescent microscope (Olympus BX51).

Analytical measurements

The concentration of total membrane proteins was assayed by dye-binding Lowry (Folin-Ciocalteu's reagent, Fluka Chem. AG, Switzerland) procedure (Lowry *et al.*, 1951).

The amount of phosphate was determined by the modified method of Bartlett (Bartlett, 1972).

The concentration of total neutral membrane carbohydrates was determined by means of Dreywood's Anthrone reagent (Morris, 1948).

LPS were extracted from the *Z. mobilis* cells using an adapted of the phenol-water method (Westphal, 1952). The carbohydrate content of the LPS was determined using the phenol-sulphuric acid assay (Dubois *et al.*, 1956; Piater, 2005).

In order to release proteins from *Z. mobilis* envelopes a procedure of mild extraction (Dyé & Delmotte, 1997) was performed.

The extracellular levansucrase (EC 2.4.1.10) in the incubation medium was assayed spectrophotometrically (UV 260, Shimadzu, Japan) by measuring the initial velocity of levan formation at 330 nm ($\xi=0.514 \times 10^{-6}$ l/mol cm) and expressed as activity units (U) per mg dry mass of cells in incubation medium.

The biomass concentration was determined spectrophotometrically at 550 nm using the calibration curve.

The total activity of proteolytic enzyme (EC 3.4.) was determined according to the Kunitz method (Kunitz, 1947). One unit of proteinase activity was defined as the quantity of enzyme, necessary to increase the optical density for 0.01 at OD₂₈₀ under test conditions (Kabadjova-Hristova *et al.*, 2006).

Evaluation of cell attachment to solid surfaces

Standard microscope glass slides were cleaned and silanized by 0.02M dimethylchlorsilane (*Sigma*) in toluene (*Sigma*) as reported elsewhere (Batischev & Indenbom, 2004) to obtain hydrophilic and hydrophobic surfaces, respectively. Fresh cell suspensions in 50mM phosphate buffer (pH 7.1) were incubated together with glass slides for 40 min and rinsed gently in 0.1M phosphate buffered saline to remove nonattached cells. The number of cells adhering to the surface were counted under a light microscope at 50 randomly selected fields of vision and expressed as an average cell count per field. The glass adherence test (Pérez *et al.*, 1998) was performed for comprehensive evaluation of cell attachment to hydrophilic surfaces after growth for 24h in cleaned, standard glass test tubes containing 10 ml of medium.

FT-IR spectroscopy

FT-IR absorption spectra of cells and cell envelopes were registered on a microplate reader HTS-XT (BRUKER) (Harrigan *et al.*, 2004). 10 – 30 μ l of each sample were dried on a 96 place silicon plate at T<50 °C, spectra collected over the wavenumber range of 4000 – 600 cm⁻¹, 64 scans, with resolution 4

cm⁻¹. The data were processed with OPUS 6.5 (BRUKER) software; baseline corrected by rubberband method and vector normalization was performed to square the differences in spectral line intensities, i.e. due to suspension concentrations of different samples (Severcan & Harris, 2012). Only spectra with absorption in the range of 0.25 - 0.80, providing Lambert-Buger-Beer law to be executed, i. e. intensity is directly proportional to the concentration were analyzed.

Fluorescence titration measurements

The effects of cells surface hydrophobicity on the binding of increasing amount (1 - 5 µM) of the fluorescent lipophilic dye 1-*N*-Phenylnaphthylamine (PNA) (Träuble & Overath, 1973) by *Z. mobilis* cells (3.0 mg/ml cells in 50mM phosphate buffer pH 7.1) were determined on a Fluorichrom (Varian, Inc., CA, US) fluorimeter equipped by Coach (Couch Suplex MA, US) software at 345 nm for excitation and 405 nm for emission (Tsuchido *et al.*, 1989).

Data processing and analysis

All procedures were performed for cells from three independent cultivations at least.

All analytical measurements for each sample were performed in triplicate at least.

Factor-experiments were carried out accordingly with 2², 3² (central and even plans) factor gradation.

The data were processed by analysis of variance (MANOVA), multiple, linear and nonlinear regressions using the software Statgraphics[®] Plus (Manugistics, Inc., US) and SPSS 11.0 for Windows (SPSS Inc. Ill., US). To evaluate the statistical significance of regression models the F-test was performed.

At least 200 CFU for each viable cell count was employed to compute the log reduction (Δ log CFU).

AN OUTLINE OF THE RESULTS

I. A possibility that the CSH of Gram-negative bacteria *Z. mobilis* and Gram-positive bacteria *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 could be different and affected by multiple external factors (temperature and phase of growth, concentration or type of carbon source, presence or absence of oxygen or amphiphilic compounds) was assessed by corresponding estimates of these strains simultaneously cultivated under different conditions. It was detected, that the Gram-negative bacteria *Z. mobilis* was strongly hydrophilic in comparison to Gram-positive bacteria *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 (Table 1). At the same time, the CSH of all examined cultures responded to the changes of growth phases and carbon source (Table 1).

Table 1. Changes of the cell surface hydrophobicity of *Z. mobilis*, *L. acidophilus* and *B. lactis* strains upon the used carbon source and the phase of growth (Zikmanis *et al.*, 2007; Shakirova *et al.*, 2010).

Strain	Hydrophobicity, % \pm S.E.			
	Growth phase			
	Logarithmic		Stationary	
	Carbon source			
	Glucose	Sucrose	Glucose	Sucrose
ZM 29191	4.15 \pm 0.19	5.25 \pm 0.19	6.19 \pm 0.19	6.22 \pm 0.19
ZM 113S	10.10 \pm 0.19	13.75 \pm 0.19	18.07 \pm 0.19	22.61 \pm 0.19
La 5	41.10 \pm 0.47	55.50 \pm 0.33	57.40 \pm 0.47	60.40 \pm 0.33
Bb12	56.80 \pm 0.89	61.20 \pm 0.70	60.27 \pm 0.89	62.27 \pm 0.70

On the other hand, the CSH of *Z. mobilis* 113S, as well as probiotic bacteria *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 substantially increased in proportion to the concentration of carbohydrate in the cultivation medium (Table 2). The use of sucrose for *Z. mobilis* 113S and lactose for *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 as the sole carbon source resulted in the higher values of CSH (Table 2).

In a similar way the CSH of *Z. mobilis* 113S responded to changes of cultivation temperature in the range of suboptimal (25°) to elevated (37°) values (Table 2). The observed pattern of CSH values was completely concordant in respect of independent (MATH and SAT) measurement procedures (Table 2). At the same time, the changes of cultivation temperature didn't significantly affect the CSH of both probiotic cultures *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 (data not shown).

It should be noted, that the presence of prebiotic compound levan (β -2,6-polyfructan) in the cultivation medium markedly influenced the surface hydrophobicity of *L. acidophilus* La5. Thus, the addition of levan at the range of concentration 1% – 4% to the cultivation medium with lactose leads to increasing the CSH from 62% to 82%.

On the other side, it was detected that the presence of oxygen during cultivation affected the CSH of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 strains in a different way. Thus, under aerobic conditions the CSH values of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 was found to increase or decrease, respectively while under anaerobic conditions a pronounced opposite effect on CSH was detected (Fig. 3.1.).

Table 2. Effect of varied growth conditions on the cell surface hydrophobicity of *Z. mobilis* 113S, *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 (Zikmanis *et al.*, 2007; Shakirova *et al.*, 2013).

Strain	Growth conditions			Hydrophobicity, % ± S.E.	Cells aggregating saline, M
	Carbon source	Concentration, M	Temperature, °C		
ZM113S	Glucose	0.16	30	15.59 ± 0.47	>2.0
		0.28	30	20.38 ± 0.68	1.8
		0.56	30	39.82 ± 0.45	0.8
	Sucrose	0.16	30	19.12 ± 0.33	1.8
		0.28	30	29.95 ± 0.70	1.4
		0.56	30	66.74 ± 0.16	0.2
	Glucose	0.28	25	19.17 ± 0.61	1.8
		0.28	30	23.18 ± 0.61	1.6
		0.28	37	43.25 ± 0.61	0.8
Presence of O ₂					
La5	Glucose	0.13	+	57.40 ± 0.47	n. d.
		0.26	+	62.90 ± 0.68	n. d.
		0.39	+	66.87 ± 0.45	n. d.
	Sucrose	0.13	+	60.40 ± 0.33	n. d.
		0.26	+	64.30 ± 0.70	n. d.
		0.39	+	67.90 ± 0.16	n. d.
	Lactose	0.13	+	68.45 ± 0.61	n. d.
		0.29	+	70.23 ± 0.61	n. d.
		0.39	+	75.13 ± 0.61	n. d.
Bb12	Glucose	0.13	—	60.27 ± 0.89	n. d.
		0.26	—	64.56 ± 0.80	n. d.
		0.39	—	70.40 ± 0.80	n. d.
	Sucrose	0.13	—	62.27 ± 0.70	n. d.
		0.26	—	66.40 ± 1.06	n. d.
		0.39	—	72.75 ± 0.70	n. d.
	Lactose	0.13	—	72.75 ± 0.60	n. d.
		0.26	—	76.75 ± 0.65	n. d.
		0.39	—	79.37 ± 1.00	n. d.

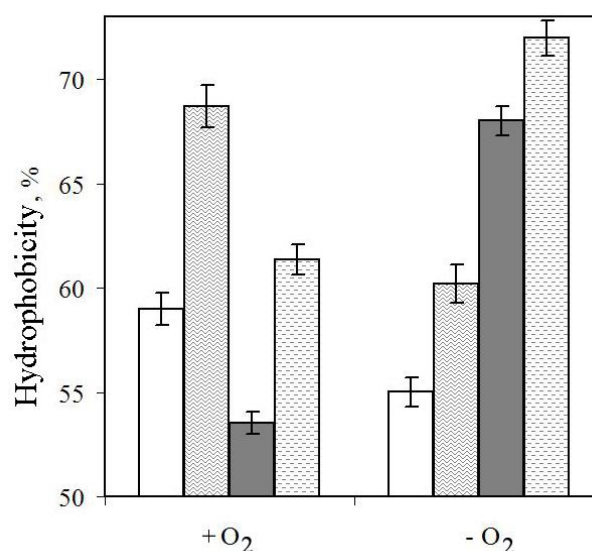


Fig. 3.1. Changes of the cell surface hydrophobicity of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 upon the employed carbon source and the presence of oxygen: □ - *L. acidophilus* La5 (0.13M glucose); ▨ - *L. acidophilus* La5 (0.13M lactose); ■ - *B. lactis* Bb12 (0.13M glucose); ▩ - *B. lactis* Bb12 (0.13M lactose) (Sakirova *et al.*, 2013).

Addition of amphiphilic compounds such as aliphatic alcohols and Tween-type surfactants in the cultivation medium could markedly influence the surface properties of bacterium *Z. mobilis* 113S. Thus, a more profound increase of CSH and the protein concentration in the medium concomitantly with opposite changes of the levansucrase activity was observed for shorter alcohols in proportion to alkyl chain growth (n-butanol – n-heptanol) in comparison with higher alcohols (Table 3). An influence of Tween-type surfactants on the cell surface properties of *Z. mobilis* 113S appeared as a slight but significant decrease of the hydrophobicity, as well as the levansucrase activity and the protein secretion provoked by the smallest molecular mass compound (Tween20) and a pronounced opposite effect caused by larger (Tween80) surfactant (Table 3).

Table 3. Modulation of cell surface hydrophobicity, levansucrase activity and protein content in the incubation medium of *Z. mobilis* 113S by amphiphilic compounds (Zikmanis *et al.*, 2005; Zikmanis *et al.*, 2007).

Amphiphilic compound	Concentration	Parameters of alterations in cell surface			
		Hydrophobicity, % ± S.E.	Cells aggregating saline, M	Levansucrase secretion, (% to control)	Protein secretion, (% to control)
none	-	21.87 ± 1.84	1.8	100.00	100.00
n-butanol,	1mM	28.80 ± 1.30	1.4	97.95	126.83
n-pentanol	1mM	35.60 ± 0.89	1.0	88.04	145.82
n-heptanol	1mM	41.78 ± 0.35	0.8	64.73	157.46
n-dodecanol	40μM	22.98 ± 0.41	1.8	81.30	133.29
n-tetradecanol	40μM	23.37 ± 0.97	1.6	78.95	119.58
Tween80	46μM	56.54 ± 0.26	≤0.4	127.00	121.00
Tween20	49μM	17.30 ± 0.53	>2.0	70.00	115.00

The simultaneous consideration of factors such as the presence of amphiphilic compounds and cultivation temperature (Fig. 3.2.) by means of 2²-factor experiments (Fig. 3.2.) confirmed the significant ($P < 0.001$) contribution of both factors on the surface properties of *Z. mobilis* 113S, as well as their interaction. Since the magnitude of the effect of one independent variable (temperature) on a dependent variable (CSH) varied as a function of a second independent variable (amphiphilic compound). Thus, the fall of CSH caused by suboptimal (25°) cultivation temperature to a significant extent was “taken off” due to the participation of Tween20 (Fig. 3.2.). In a similar way the simultaneous influence of elevated (37°) cultivation temperature and Tween80 appeared as somewhat reduced combined effect in regard to individual potencies of both factors (Fig. 3.2.). Similarly, antagonistic interactions were observed for various other combinations of factors (e. g., the presence of Tween80 at suboptimal cultivation temperature etc.). Nevertheless, the highest CSH values (~ 50%) of *Z. mobilis* 113S were achieved by the simultaneous influence of elevated temperature and Tween80 in the cultivation medium (Fig. 3.2.).

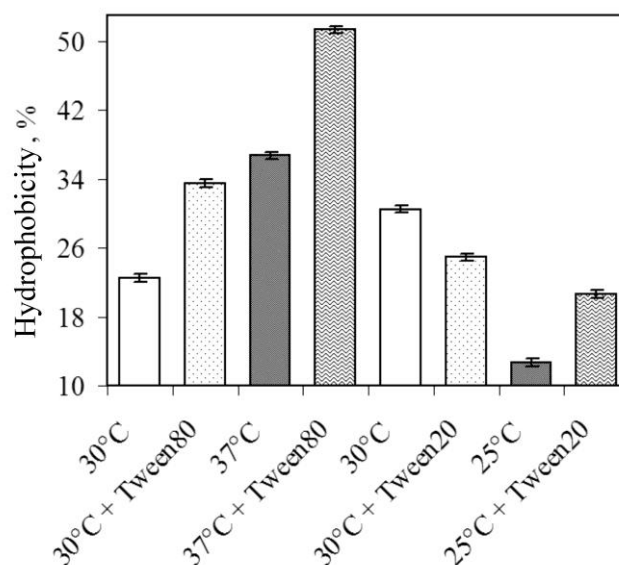


Fig. 3.2. Effect of surfactants and temperature on the cell surface hydrophobicity of *Z. mobilis* 113S (Zikmanis *et al.*, 2007).

II. The ability of *Z. mobilis* 113S, *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 to survive under adverse conditions of freezing/thawing, freeze-drying/rehydration cycle as well as during long-term storage was found to correlate with the CSH values for intact bacterial cells. Inverse linear relationships (Fig. 3.3. and 3.4.) were detected between the CSH and the survival of these bacterial strains exposed to freeze-thawing, freeze-drying/rehydration cycle and long-term storage. At the same time, the ability of *Z. mobilis* 113S to survive under exposure to elevated ethanol concentration was found to decrease with an increase of CSH values of intact bacterial cells. The lowest reduction of survival was during exposure of intact cells to the fixed (Fig. 3.4.) or growing (Fig. 3.5.) concentration of ethanol, particularly at the range of low (24 – 56 %) CSH values.

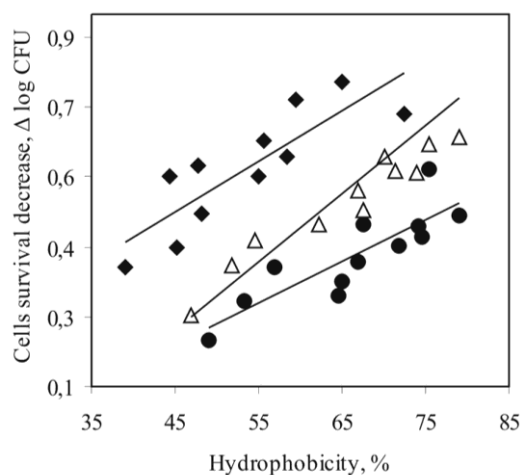


Fig. 3.3. The relationship between the cell surface hydrophobicity and survival decrease of intact *L. acidophilus* La5 cells exposed to freezing/thawing cycle (◆) ($r = 0.849$, $P < 0.01$) and *B. lactis* Bb12 cells exposed to freezing/thawing cycle (●) ($r = 0.854$, $P < 0.01$) and storage (Δ) ($r = 0.843$, $P < 0.01$) (Shakirova *et al.*, 2013).

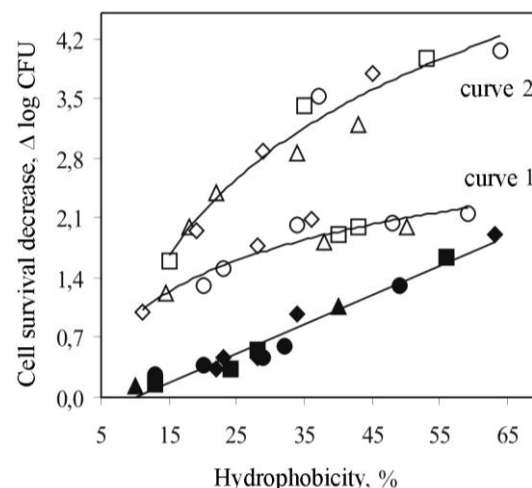


Fig. 3.4. The relationship between the cell surface hydrophobicity of intact *Z. mobilis* 113S and viability of cells subjected to subsequent freezing/thawing, freeze-drying/rehydration procedure (open symbols, curve 1 ($r = 0.973$, $P < 0.001$)) or affected by 2.55 M ethanol concentration (closed symbols, $r = 0.976$, $P < 0.001$). Different symbols indicate the data of independent experiments (Shakirova *et al.*, 2008).

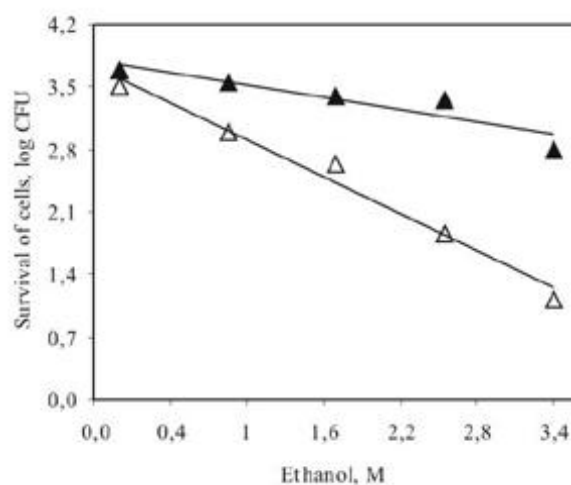


Fig. 3.5. The viable cell count of *Z. mobilis* 113S with different cell surface hydrophobicity affected by elevated ethanol concentrations in the incubation medium. Where CSH of 24% and 56% as the closed symbols ($r = -0.918$, $P < 0.02$) and open symbols ($r = -0.989$, $P < 0.01$), respectively (Shakirova *et al.*, 2008).

Other physiological factors that may influence the cell viability, especially *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12, are low external pH and an elevated concentration of bile salt. It was detected, that the survival of both strains decreases significantly after incubation at pH 3 and only 30 min treatment (Fig. 3.6.).

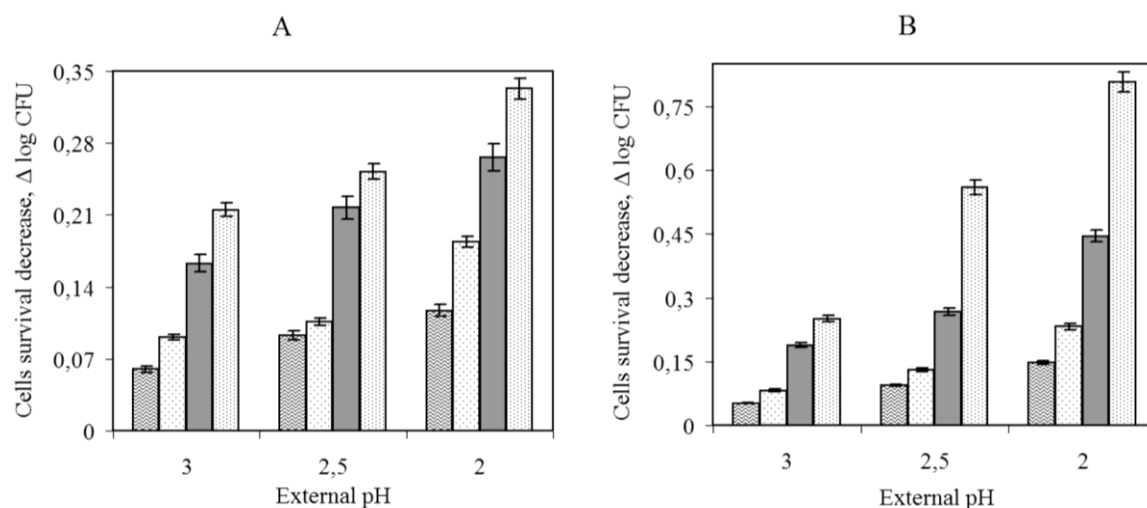


Fig. 3.6. Survival decrease of *L. acidophilus* La5 (A) (▨ - 30 min, CSH = 35%; □ - 30 min, CSH = 54%, ■ - 120 min, CSH = 35%; ▤ - 120 min, CSH = 54%) and *B. lactis* Bb12 (B) (▨ - 30 min, CSH = 52.7%; □ - 30 min, CSH = 69.5%; ■ - 120 min, CSH = 52.7%; ▤ - 120 min, CSH = 69.5%) exposed to mineral acid (Shakirova *et al.*, 2013).

The highest survival reduction of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 (46% and 84%, respectively) was detected after 120 min incubation at pH 2 (Fig. 3.7.). At the same time, inverse linear relationships were detected between the CSH and survival of both bacterial strains exposed to low external pH values (Fig. 3.7.) and 3% bile acid (Fig. 3.8.), thus confirming a substantially reduced ability of hydrophobic bacteria to survive under adverse environments.

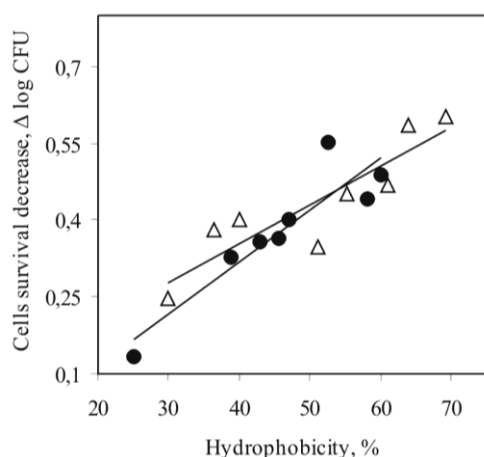


Fig. 3.7. The relationship between the cell surface hydrophobicity and survival decrease of *L. acidophilus* La5 (●) ($r = 0.912$, $P < 0.01$) and *B. lactis* Bb12 (Δ) ($r = 0.896$, $P < 0.01$) cells exposed to mineral acid (HCl, pH 2, 120 min) (Shakirova *et al.*, 2013).

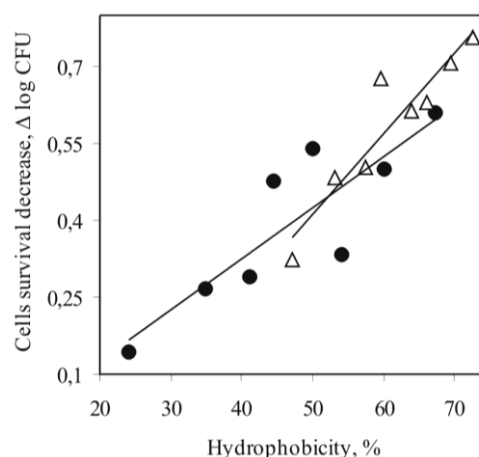


Fig. 3.8. The relationship between the cell surface hydrophobicity and survival decrease of *L. acidophilus* La5 (●) ($r = 0.862$, $P < 0.01$) and *B. lactis* Bb12 (Δ) ($r = 0.935$, $P < 0.01$) cells exposed to 3% bile acid, 120 min (Shakirova *et al.*, 2013).

In addition, a decrease of CSH of *B. lactis* Bb12 was detected after incubation in presence of mineral acid (HCl) or bile acid (Table 4). CSH decrease was more pronounced in the presence of 3% bile acid, especially in hydrophilic cells. The influence of mineral acid on CSH appeared to be similar, however less perceptible (Table 4).

Table 4. The changes of the cell surface hydrophobicity of *B. lactis* Bb12 exposed to acidic conditions (Shakirova *et al.*, 2013).

Treatment	Hydrophobicity, % ± S.E.		
	Control (intact cells)	After treatment (120 min)	Relative decrease
HCl (pH 2)	55.6 ± 0.17	51.1 ± 0.19	8.1
	57.3 ± 0.19	55.0 ± 0.16	4.0
Bile acid (3%)	47.2 ± 0.18	20.0 ± 0.20	57.6
	61.2 ± 0.18	34.1 ± 0.19	44.3

Alterations in the hydrophobic properties caused by multiform environmental factors (Table 2, 3) differently affected the ability of bacteria *Z. mobilis* 113S to adhere to hydrophilic and hydrophobic surfaces. The number of adhering cells on the silanized (i. e. hydrophobic) glass surfaces (Fig. 3.9.) was in a direct proportion to the values of CSH whereas an opposite linear relationship appeared for the clean (i. e. hydrophilic) glass surfaces (Fig. 3.9.) suggesting that hydrophobic properties are directly responsible for the alteration in adhesion ability of *Z. mobilis* 113S.

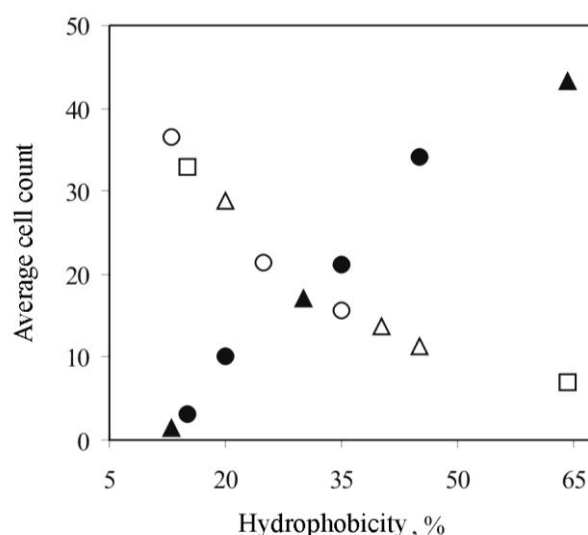


Fig. 3.9. The relationship between the number of adhering cells on hydrophilic (open symbols) and hydrophobic (closed symbols) glass slides and the cell surface hydrophobicity of *Z. mobilis* 113S. Different symbols indicate the date of independent experiments (Zikmanis *et al.*, 2007).

In order to estimate relations between CSH and barrier function (membrane permeability) of *Z. mobilis* 113S and *L. acidophilus* La5 cells the levansucrase and proteolytic activity, as well as total protein release in the medium were measured. The proteolytic activity and the total amount of secreted protein in the medium during incubation of *L. acidophilus* La5 cells were markedly dependent on CSH values. Thus, the concentration of secreted protein and the activity of proteolytic enzyme were found to increase in direct proportion to the increased CSH values (Fig. 3.10.). In addition, the total amount of secreted protein elevated in the medium of *Z. mobilis* 113S as the linear function of CSH values (Fig. 3.11.) most probably is indicating the impaired barrier function of more hydrophobic cells. In turn, the levansucrase activity in the cultivation medium of *Z. mobilis* 113S cells was inversely proportional to the hydrophobicity estimates (data not shown). In addition, fluorescence titration was carried out and the significant linear relationship ($r = 0.968$; $P < 0.001$) was found between the values of initial rate for NPN permeation into bacterial cells and CSH (Fig. 3.11).

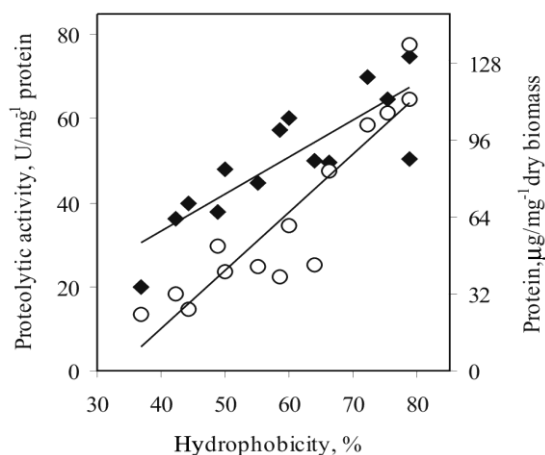


Fig. 3.10. The relationship between the cell surface hydrophobicity and the proteolytic activity (◆) ($r = 0.846$, $P < 0.01$) and the total amount of secreted protein in the medium (○) ($r = 0.706$, $P < 0.01$) of *L. acidophilus* La5 during incubation (Shakirova *et al.*, 2013).

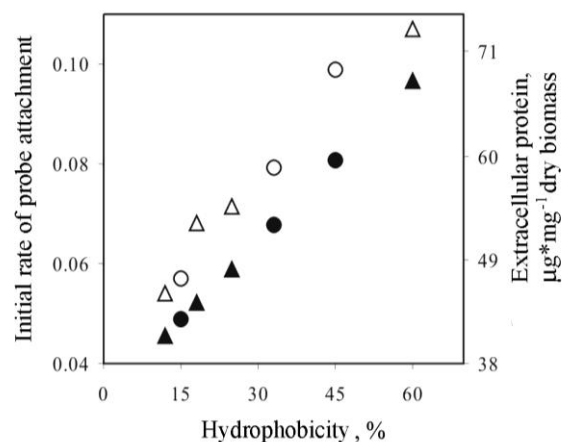


Fig. 3.11. The relationship between the cell surface hydrophobicity and initial rate of NPN permeation into the *Z. mobilis* 113S cells (open symbols) and the concentration of the extracellular protein (closed symbols). Different symbols indicate the date of independent experiments (Zikmanis *et al.*, 2007).

III. Independent analytical measurements of *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 and *Z. mobilis* 113S cell envelopes carbohydrate, protein and lipid concentrations of were performed. Biochemical characteristics for all examined strains with varied CSH displayed significant correlative relationships (Fig. 3.12. and 3.13.). The decrease of carbohydrate levels were observed in proportion to the increased CSH values of both probiotic strains alongside with the elevated protein and lipid content in more hydrophobic cells (Fig. 3.12.). At the same time, a gradual reduction of the carbohydrate content was detected in the LPS fraction of more hydrophobic *Z. mobilis* 113S cells (Fig. 3.13.) concomitantly with a proportional decrease of KDO concentration ($r = -0.929$, $P < 0.001$) in corresponding LPS samples (data not shown). On the contrary, the content of extractable cell surface proteins graduated in a direct proportion to the rise of *Z. mobilis* 113S CSH level (Fig. 3.13.). Observed significant ($P < 0.01$) relationships indicate that proportions of both hydrophilic (carbohydrate/LPS) and hydrophobic (surface proteins and lipids) constituents of the cell envelope could be responsible for the overall CSH of bacteria.

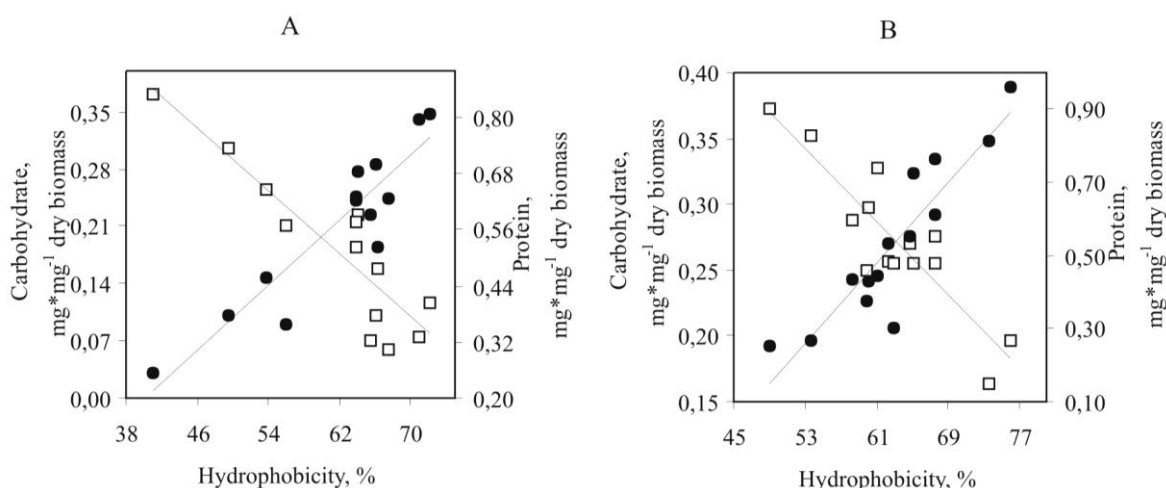


Fig. 3.12. The relationship between the cell surface hydrophobicity of *L. acidophilus* La5 (A) and *B. lactis* Bb12 (B) cell envelopes and the carbohydrate level (□) ($r = -0.896$, $P < 0.01$ (A) and $r = -0.893$, $P < 0.01$ (B)), and protein content (●) ($r = 0.921$, $P < 0.01$ (A) and $r = 0.906$, $P < 0.01$ (B)) (Shakirova *et al.*, 2013).

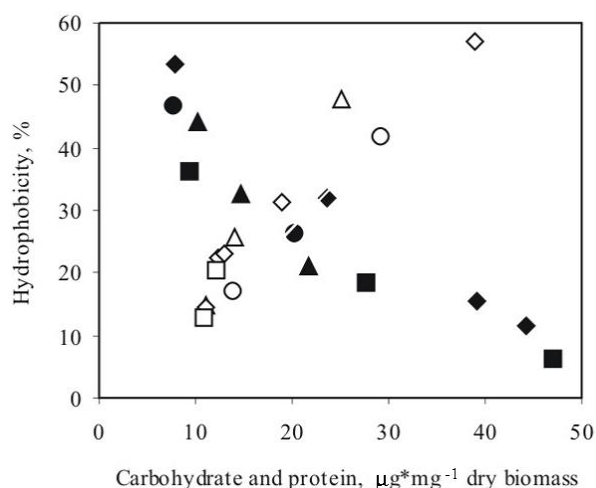


Fig. 3.13. The relationship between the cell surface hydrophobicity and the carbohydrate level (closed symbols, $r = -0.957$, $P < 0.001$) of lipopolysaccharides, and surface protein content (open symbols, $r = 0.971$, $P < 0.001$) of *Z. mobilis* 113S cells. Different symbols indicate the data of independent experiments (Shakirova *et al.*, 2008).

Analysis of *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 and *Z. mobilis* 113S cell envelope FT-IR spectra revealed substantial changes of the chemical composition depending on the CSH of bacteria. Cell envelopes of these bacteria with different CSH exhibited noticeable variation of band absorbance and wavenumber at the lipid ($3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$), protein ($1700 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) and carbohydrate ($1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$) regions (Table 5). Comparison of *Z. mobilis* 113S hydrophilic and hydrophobic cells fraction spectra showed variations of the absorption bands intensities and wavenumbers (i. e. the peak position) (Table 6).

In the region between 3000 cm^{-1} and 2800 cm^{-1} , representing the absorption modes of fatty acid chains (e.g., membrane phospholipids), significant direct relationships were found between the CSH of *Z. mobilis* 113S, *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 and the absorbance intensities assigned to the asymmetric and symmetric stretching of methyl groups ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ and $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$, respectively) (Table 5). Furthermore, significant inverse relationships were detected between CSH of these bacteria and the band position variation of asymmetric and symmetric stretching of methylene groups ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ and $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$), respectively (Table 5).

In the spectral region between 1745 cm^{-1} and 1735 cm^{-1} , which represents the absorption modes of alkyl esters and fatty acids, a significant direct relationship was detected between the CSH values of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 and the absorbance intensities assigned to the alkyl esters ($>\text{C}=\text{O str}$) (Table 5).

For vibrations in the spectral region between 1700 cm^{-1} and 1500 cm^{-1} , which represents the absorption modes of Amide I and Amide II, C-N *str* of protein and peptides amide, a significant direct relationship was detected between the CSH of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 and the band position variation of Amide I and Amide II (Table 5). In turn, inverse relationship was detected between CSH of *Z. mobilis* 113S and the band position variation of Amide I, and direct relationship between the band position variation of Amide II and CSH of *Z. mobilis* 113S (Table 5).

The spectra region between 1200 cm^{-1} and 900 cm^{-1} , assigned to carbohydrates showed a significant inverse relationship between the CSH of *Z. mobilis* 113S, *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 and the absorbance intensities was detected (Table 5). At the same time, a significant positive correlation was found between CSH of these bacteria and the band position of carbohydrate.

Table 5. The relationship between the cell surface hydrophobicity of *Z. mobilis* 113S, *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 and FT-IR absorption band intensities and wavenumbers (Shakirova *et al.*, 2013).

Parameter to be correlated	FT-IR spectra band assignment and wavenumbers	Correlation coefficient, Spearman's (ρ)		
		ZM113S, n = 21	LA5, n = 13	Bb12, n = 13
CSH and Absorption intensities	$\nu_{as}(\text{CH}_3) \sim 2955 \text{ cm}^{-1}$	0.505*	0.829**	0.705**
	$\nu_{as}(\text{CH}_2) \sim 2922 \text{ cm}^{-1}$	0.576**	0.898**	0.602*
	$\nu_{sym}(\text{CH}_3) \sim 2872 \text{ cm}^{-1}$	0.555**	0.853**	0.641*
	$\nu_{sym}(\text{CH}_2) \sim 2852 \text{ cm}^{-1}$	0.580**	0.909**	0.717 **
	Amide I $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$	n. d.	0.872**	0.691**
	Amide II $\sim 1545 \text{ cm}^{-1}$	n. d.	0.852**	0.603*
	$>\text{C}=\text{O str}(\text{esters}) \sim 1740 \text{ cm}^{-1}$	n. d.	0.697**	0.662*
	$\text{C}-\text{O}-\text{C}, \text{C}-\text{O str}(\text{carbohydrates}) \sim 985 \text{ cm}^{-1}$	-0.445*	- 0.814**	- 0.735**
CSH and Vibration band position/ wavenumbers (cm^{-1})	$\nu_{as}(\text{CH}_2) \sim 2922 \text{ cm}^{-1}$	- 0.649**	- 0.760**	- 0.653*
	$\nu_{sym}(\text{CH}_2) \sim 2852 \text{ cm}^{-1}$	- 0.651**	- 0.547*	- 0.645*
	Amide I $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$	- 0.434*	n. d.	0.584*
	Amide II $\sim 1545 \text{ cm}^{-1}$	0.469*	0.797**	n. d.
	$\text{C}-\text{O}-\text{C}, \text{C}-\text{O str}(\text{carbohydrates}) \sim 985 \text{ cm}^{-1}$	0.645**	0.757**	0.405*

** Correlation is significant at the 0.01 level.

* Correlation is significant at the 0.05 level.

Table 6. The variation of differences of absorption band intensities and wavenumbers between the hydrophilic and hydrophobic cell fractions of *Z. mobilis* 113S (Shakirova *et al.*, 2013).

Cell surface properties		Hydrophilic, n = 10	Hydrophobic, n = 11	Significance of differences (p)
FT-IR spectra peaks		Absorption intensities, A. U.***		
The groups, which have variations of absorption intensities	$\nu_{as} (CH_3)$	62.75 ± 3.25	79.18 ± 5.55	0.0220*
	$\nu_{as} (CH_2)$	34.80 ± 2.39	47.82 ± 4.53	0.0232*
	$\nu_{sym} (CH_3)$	97.55 ± 7.89	145.14 ± 15.56	0.0265**
	$\nu_{sym} (CH_2)$	45.45 ± 4.58	72.45 ± 9.10	0.0017**
	$>C=O \text{ str (esters)}$	27.25 ± 1.30	35.41 ± 2.47	0.0066**
		Wavenumbers (cm^{-1}) of vibration band maximum		
The vibration groups, which have wavenumbers shifts	$\nu_{as} (CH_2)$	2924.68 ± 0.21	2923.61 ± 0.27	0.0067**
	$\nu_{sym} (CH_3)$	2873.93 ± 0.25	2872.48 ± 0.54	0.0373**
	$\nu_{sym} (CH_2)$	2853.91 ± 0.13	2853.28 ± 0.18	0.0151**
	$>C=O \text{ str (esters)}$	1734.19 ± 0.24	1741.84 ± 0.81	0.0430**
	Amide I	1654.93 ± 0.14	1653.33 ± 0.87	0.0410**
	Amide II	1542.89 ± 0.19	1543.41 ± 0.16	0.0480*
	C–O–C, C–O str (in carbohydrates)	970.19 ± 0.67	975.57 ± 1.47	0.0046*

* Parametric t - test

** Nonparametric W – test

*** Arbitrary Units

In order to examine the relationships between the concentrations of proteins, carbohydrates and lipids of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 cell envelopes and FT-IR spectral data the quantitative calibration was performed by means of the OPUS program (2nd order polynomial equations). The data obtained from FT-IR spectra quantitative analysis and biochemical determinations were found to be consistent (Table 7).

Table 7. The principal macromolecular component concentration of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 cell envelopes, determined by chemical analyses and FT-IR methods (calibration equations) (Shakirova *et al.*, 2013).

Strain	Analytical chemical analysis of membrane			IR-quantitative analysis of membrane ^a		
	Proteins	Carbohydrates	Lipids	Proteins	Carbohydrates	Lipids
	mg/mg ⁻¹ dry biomass \pm S.E.			mg/mg ⁻¹ dry biomass \pm S.E.		
La5	0.572 ± 0.047	0.180 ± 0.017	0.153 ± 0.012	0.569 ± 0.066	0.173 ± 0.027	0.156 ± 0.020
Bb12	0.541 ± 0.028	0.268 ± 0.015	0.105 ± 0.008	0.544 ± 0.101	0.277 ± 0.051	0.101 ± 0.012

^a The estimates from the quantitative calibration equations, where: X – the absorption peak intensities; Y – component value (proteins, carbohydrates or lipids) calculated from absorption intensities (at 1660 cm^{-1} , 1088 cm^{-1} and 2930 cm^{-1} , respectively).

DISCUSSION

I. The CSH examination of *Z. mobilis*, *L. acidophilus* and *B. lactis* strains showed (Table 1) that the cell wall of Gram-negative bacteria *Z. mobilis* is much more hydrophilic in comparison with that of Gram-positive bacteria *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 (Zikmanis *et al.*, 2007; Shakirova *et al.*, 2010). These results are in agreement with a common view that Gram-positive bacteria should be considered as more hydrophobic in comparison to Gram-negative organisms due to markedly hydrophobic constituents of the cell envelope (Vanhaecke *et al.*, 1990; Aono & Kabayashi, 1997; Nikaido, 2003; Schar-Zammaretti & Ubbink, 2003).

Alongside with the reported data that CSH is highly strain-specific, i.e. variable at a wide range within genera (Nikovskaya *et al.*, 1989; Aono & Kabayashi, 1997; Kos *et al.*, 2003; Karimi Torshizi *et al.*, 2008), we have detected (Zikmanis *et al.*, 2007; Shakirova *et al.*, 2013) that CSH can be affected by environmental conditions (phase of cultivation and growth rate, medium composition, temperature etc.) (Table 1 and 2).

Different carbon sources can influence the composition of cell outer membrane. Thus, the increased glucose concentration in the growth medium leads to changed membrane properties of *Z. mobilis* cells (Doelle *et al.*, 1982), most likely leading to more hydrophobic cell surface. Similar changes were observed during examination of different carbon source and its concentration influence on *Z. mobilis* CSH (Table 2) (Zikmanis *et al.*, 2007). Depending of the substrate concentrations, the CSH of *Z. mobilis* grown in glucose medium was lower than for cells grown in sucrose. At the same time, the presence of lactose in the cultivation medium in comparison to glucose or sucrose endowed the highest CSH values for *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 (Table 2) (Shakirova *et al.*, 2013). Similar effect on the surface properties was reported for *Lactococcus lactis* grown with lactose (Kimoto-nira *et al.*, 2010).

It is known that fructan-containing prebiotics (for example, levan) can influence the growth and survival of probiotic LAB (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). In our study the positive effect of levan on the CSH of *L. acidophilus* La5 was observed, thus indicating that levan promotes not only the productivity of probiotic bacteria (Semjonovs *et al.*, 2008), and therefore could be used in cultivation medium in combination with lactose to obtain more hydrophobic surface of bacteria (up to 82%) (Shakirova *et al.*, 2013). At the same time, the elevated CSH values (up to 43%) of *Z. mobilis* 113S in proportion to an increasing concentration of added sorbitol (Zikmanis *et al.*, 2007) were also observed at a fixed concentration of catabolized carbon source in the medium. It is possible that this effect causes changes of the environment-cell osmotic gradient and the compensatory responses (Wood, 1992) that reflect in changes of structure and biochemical composition.

It should be noted that changes of cultivation temperature did not significantly affect the CSH of both probiotic cultures (Table 2) in comparison with *Z. mobilis* 113S (Zikmanis *et al.*, 2007; Shakirova *et al.*, 2013). The detected increase of *Z. mobilis* 113S CSH in response to increased cultivation temperature (Table 2) most likely is due to the influence of temperature on the composition of membrane, as with the increase of temperature could be changed the ratio of fatty acids and phospholipids (Benschoter & Ingram, 1986).

It is known that the oxygen can affect the metabolism and biochemical properties of *Bifidobacterium spp.* Besides, it has been shown that the *L. acidophilus* strain is more oxygen-tolerant (Talwalkar & Kailasapathy, 2004). In our studies diverse effects of oxygen on the CSH values were observed under aerobic cultivation of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 (Fig. 3.1.) (Shakirova *et al.*, 2013) that can indicate to the structural responses and surface modifications of bacteria, as Talwalkar (Talwalkar & Kailasapathy, 2004) have reported that *B. longum* exposed to oxygen underwent changes in its cellular fatty acid profiles.

Our studies showed that the surface properties of *Z. mobilis* can be significantly modified by means of aliphatic alcohols and surfactants (Table 3) (Zikmanis *et al.*, 2005; Zikmanis *et al.*, 2007). Aliphatic alcohols in media adversely affected the secretion of levansucrase, while the total protein

concentration in the medium and the CSH increased with the increase of the aliphatic alcohol chain length (Table 3). It has been reported that both lipophilic and amphiphilic compounds affect cell membranes and reduce the barrier functions of the cell, impairing the structural integrity of membranes (Sikkema *et al.*, 1995; Denich *et al.*, 2003). Surfactants could join to the membrane components forming surfactant-lipid and/or surfactant-protein complexes, thus affecting the phase transition of membrane, and also could reduce the lipid/protein ratio, as well as change the protein conformation and accordingly reduce the membrane associated enzyme activity (Freis, 1977). For instance, rhamnolipid even at small concentration could provoke LPS partial avulsion from the outer membrane, thus significantly increasing the CSH (Al-Tahhan *et al.*, 2000). An amplification of CSH by combined environmental factors (Fig. 3.2.) (Zikmanis *et al.*, 2007) suggests fairly good prospects to obtain *Z. mobilis* 113S with surface properties modified at a relatively wide range. On the contrary, the observed antagonistic interactions between studied factors (Fig. 3.2.) may indicate the overall contribution of distinctly affected cell envelope components.

II. Freezing represents a complex of stress conditions, when microorganisms undergo severe physiological disturbances, including a reduction in of membrane fluidity (De Angelis & Gobbetti, 2004). Membrane integrity and denaturation of macromolecules during cryoconservation have been reported as determinants of cells survival (De Angelis & Gobbetti, 2004). Thus, for example, as the temperature decreases, the proportion of shorter and/or unsaturated fatty acids in membrane lipids of *L. delbrueckii* increases (Bâati *et al.*, 2000). Results of our study of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12, as well as *Z. mobilis* 113S survival under adverse conditions of freeze-thawing cycle, long-term storage (Fig. 3.3.) (Shakirova *et al.*, 2013) or freeze-drying/rehydration (Fig. 3.4.) (Shakirova *et al.*, 2008) and the survival correlation with the CSH of these bacteria likely indicate the structural changes in the membrane, most probably in membrane lipids, due to freezing. These results suggest that the index of hydrophobicity as a general characteristic of the cell surface properties could be of value to predict the ability of intact *Z. mobilis*, as well as *L. acidophilus* and *B. lactis* to endure extreme environments and should be monitored towards lower CSH values during cultivation in order to reduce the subsequent undesirable structural and physiological disturbances.

At the same time our studies showed that elevated concentrations of ethanol adversely influence *Z. mobilis* 113S viability and hydrophilic cells have a greater potential to survive under such adverse environments (Fig. 3.4. and 3.5.) (Shakirova *et al.*, 2008). It is known that alcohol toxicity affects the hydrophobic parts of the cell, most likely on the plasma membrane. Ethanol and bio-membrane interaction results in the reduced membrane integrity (Sikkema *et al.*, 1995) and, it was shown that aliphatic alcohol and model-membrane interaction causes the phase transition temperature shift (Eliasz *et al.*, 1976).

Another important environmental stress factors for LAB is the presence of acids in GIT (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002; de Angelis & Gobbetti, 2004; Olejnik *et al.*, 2005; Schar-Zammaretti *et al.*, 2005; Ljungh & Wadström, 2006; Karimi Torshizi *et al.*, 2008). It is reported that pH values strongly influence the bacteria viability and the presence of bile salts in the environmental of bacterial cultures is even relatively damaging (de Angelis & Gobbetti, 2004; Olejnik *et al.*, 2005; Karimi Torshizi *et al.*, 2008). The results of our investigation (Fig. 3.6. – 3.8.) (Shakirova *et al.*, 2013) show the survival of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 as inversely proportional to the CSH level. At the same time, a direct relationship between CSH of *Bifidobacterium spp.* and its pH tolerance was shown (Heller, 2001). Hence the results of our investigation (Fig. 3.6. and 3.7.) (Shakirova *et al.*, 2013) confirm that more hydrophilic cells have a greater possibilities to survive under adverse environments and, moreover, irrespective to the bacterial taxonomic affiliation, i.e. the same character of relationship remains also for Gram-negative bacteria *Z. mobilis* 113S (Fig. 3.4. and 3.5.) (Shakirova *et al.*, 2008).

Comparison of the negative effect of mineral and bile acids on the survival of both probiotic strains showed that the decrease of survival caused by bile salts was higher than caused only by low external pH values (Fig. 3.7. and 3.8.) (Shakirova *et al.*, 2013), especially for hydrophobic cells. This could indicate the destructive action of bile salts on phospholipids in cell membranes which results in the

loss of cell integrity. It was noted that bile salts affect the lipid emulsifier and can destabilize the membrane integrity in bacterial cells (Olejnik *et al.*, 2005).

It was reported that bile salts in medium cause the decrease of CSH (Kos *et al.*, 2003; de los Reyes-Gavilan *et al.*, 2005). Our studies (Shakirova *et al.*, 2013) showed that the decrease of CSH of *B. lactis* Bb12 after incubation in the presence of mineral acid (HCl) or bile acids (Table 4) depends on the CSH value. It is known that cell surfaces of *lactobacilli* may adapt their CSH in response to the environmental changes, such as pH reduction (Majidzadeh Heravi *et al.*, 2011). More pronounced decrease of CSH in presence of 3% bile acid, especially in hydrophilic cells (Table 4) could indicate the tendency of cells to adapt to adverse environmental conditions towards by increasing their hydrophility.

It should be mentioned that a leakage of intracellular proteins into the medium as well as the growth of proteolytic activity in direct proportion to the increasing CSH (Fig. 3.10.) (Shakirova *et al.*, 2013) could indicate an increase of *L. acidophilus* La5 permeability. Besides, in case of *Z. mobilis* 113S it was observed that the concentration of total proteins in the cultivation medium increased with the increase of CSH (Fig. 3.11.) and the decrease of levansucrase secretion (Zikmanis *et al.*, 2007). This indicates to the inversely proportional relationships between the secretion of levansucrase and the total protein concentration in media. Unlike the levansucrase secretion in *Z. mobilis* 113S cells, the proteolytic activity of *L. acidophilus* La5 increased with the total protein amount (Fig. 3.10.), i.e. alongside with the decrease of cell permeability, that was confirmed also by the cell titration data (Fig. 3.11) gained from fluorescent probe measurements (Tsuchido *et al.*, 1989).

III. The macroscopic cell wall composition of *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 and *Z. mobilis* 113S cells with different hydrophobicities was determined using biochemical analysis. The observed relationships between the CSH of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 and the content of principal cell envelope components (Fig. 3.12.) (Shakirova *et al.*, 2013) were in agreement with a common view on the hydrophobic character of Gram-positive bacteria cell envelopes (Ikawa & Snell, 1960; Schar-Zammaretti *et al.*, 2005). Some studies of microbial cell surfaces revealed that the presence of (glyco-)proteinaceous material on the cell surface could result in a higher hydrophobicity, whereas hydrophilic surfaces could be associated with the presence of polysaccharides (Kos *et al.*, 2003; Schar-Zammaretti & Ubbink, 2003; Schar-Zammaretti *et al.*, 2005).

Generally *Z. mobilis* possess a normal Gram-negative cell wall consisting of a peptidoglycan monolayer, lipoproteins, glycoproteins and LPS layer in outer membrane (Tornabene *et al.*, 1982; Nikaido, 2003). Observed relationships between the CSH of *Z. mobilis* 113S and the content of carbohydrates and KDO in the corresponding preparations of LPS as well as the amount of cell surface proteins (Fig. 3.13.) (Shakirova *et al.*, 2008) confirm that cell wall of proteobacteria has prevalent hydrophilic character (Hammarstrom *et al.*, 1971; Osborn *et al.*, 1972; Piater, 2005). The detected significant correlations demonstrate that both hydrophilic (carbohydrate/LPS) and hydrophobic (surface proteins and lipids) cell wall component ratio could be responsible for the overall CSH of bacteria.

It should be noted that even initial FT-IR spectral analysis of *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 and *Z. mobilis* 113S intact cells indicated several changes in the cells macromolecular composition depending on CSH (Zikmanis *et al.*, 2007; Shakirova *et al.*, 2008; Shakirova *et al.*, 2010). To establish the relationships between changes in the biochemical composition of bacteria cell surface and CSH the cell envelopes of these bacteria were separated and analyzed by FT-IR spectroscopy (Shakirova *et al.*, 2013). FT-IR spectra of cell envelopes unlike the intact cell spectra were more informative and showed significant changes in absorption band intensities and wavenumber shifts at the lipid (3000 – 2800 cm⁻¹), protein (1700 – 1500 cm⁻¹) and carbohydrate (1200 – 900 cm⁻¹) regions depending on the CSH (Table 5 and 6) (Shakirova *et al.*, 2013).

It is known that various structural rearrangements in bacterial envelopes caused by changes of the H-bonding, charge/dipole, hydrophobic and van der Waals interactions amongst others damage the permeability barrier and therefore, could reduce the vital functions of cells (Blyholder *et al.*, 1995;

Nikaido, 2003). The spectral region from 3100 cm^{-1} to 2800 cm^{-1} is dominated by the absorption modes of lipid aliphatic chains (Naumann, 2002; Wang *et al.*, 2010). There are IR absorption bands due to antisymmetric and symmetric modes of the methyl chain at about 2960 cm^{-1} and 2880 cm^{-1} , correspondingly. The observed changes of FT-IR spectral indices assigned to ν_{as} (CH_3) and ν_{sym} (CH_3) vibrations indicate alternations in the orientation of methyl groups and in the chain packing mode of aliphatic residues (Sato *et al.*, 2001) with the increase of *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 and *Z. mobilis* 113S CSH values (Table 5). At the region near 2920 cm^{-1} and 2850 cm^{-1} , there are IR absorption bands, which arise due to antisymmetric and symmetric modes of the methylene chain (ν_{as} (CH_2) and ν_{sym} (CH_2)), respectively. The wavenumbers of the absorption maximum of these bands could be conformation-sensitive and respond to the temperature induced changes of the *trans-gauche* ratio in acyl chains (Naumann, 2002; Kilimann *et al.*, 2006).

IR bands at 1740 and 1725 cm^{-1} due to the stretching of the C–O bond of 1,2-diacylglycerolipid bi-layers in esters are also sensitive to the physical state of lipids (Decca *et al.*, 2007). The *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 FT-IR spectral analysis showed the significant correlation between intensities of these absorption bands and the CSH values (Table 5).

Amide I and Amide II bands are two major characteristics of protein in the IR spectrum. The Amide I band (between 1700 and 1600 cm^{-1}) is mainly associated with the C=O stretching vibration and is directly related to the backbone conformation. Amide II band results from the N-H bending vibrations and the C-N stretching vibrations. Amide bands also can be conformationally sensitive (Nichols *et al.*, 1985). It is known that an increase in amide hydrogen-bonding causes the decrease of Amide I and increase of Amide II absorption band position, i.e. wavenumbers (Alvarez *et al.*, 1987). Hence, the observed changes of FT-IR spectra indices assigned to Amide I and Amide II bands (Table 5) could be attributed to the conformational changes of the protein along with the changes of its concentration with increasing CSH values of *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 and *Z. mobilis* 113S.

The IR spectra region from 1200 to 900 cm^{-1} is mostly dominated by a sequence of bands due to C-O, C-C, C-O-C and C-O-H stretching vibrations of various oligo- and polysaccharides (Naumann, 2002) and these groups mainly occur in carbohydrates. The observed decrease of absorbance band intensities and significant wavenumber shift of bands assigned to carbohydrate vibrations along with the increase of *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 and *Z. mobilis* 113S CSH values (Table 5) indicate the decrease of carbohydrate content in bacteria cell walls (Naumann, 2002; Bosch *et al.*, 2006).

The observed multiple correlations between the concentration of proteins, carbohydrates and lipids of *Z. mobilis* 113S, *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 cell envelopes, indices of FT-IR spectra and CSH values indicate that the biochemical composition of these bacteria cells are closely linked with the CSH and reflect the complex relationships between hydrophilic (carbohydrates) and hydrophobic (proteins and lipids) cell envelope constituents.

Besides, the quite similar data of protein, carbohydrate and lipid concentrations of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12 cell envelopes obtained by quantitative analysis of FT-IR spectra and conventional biochemical methods (Table 7) (Shakirova *et al.*, 2013) suggest that FT-IR spectroscopy could be considered as a convenient approach for the quantitative and qualitative studies of bacterial cell envelopes.

CONCLUSIONS

1. The methods of experimental design allow to specify the physiological factors (carbon sources and their concentrations, temperature, growth phase, presence of oxygen and amphiphilic compounds) that alter and modify the cell surface hydrophobicity of ethanologenic (*Z. mobilis* 113S) and probiotic bacteria (*L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12).
2. Various carbon sources differently affect the cell surface hydrophobicity of ethanologenic and probiotic bacteria. Lactose in growth media significantly increases the cell surface hydrophobicity of *L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12, while sucrose in growth media increases the cell surface hydrophobicity of *Z. mobilis* 113S.
3. The cell surface hydrophobicity of ethanologenic (*Z. mobilis* 113S) and probiotic bacteria (*L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12) can be increased by elevating carbon source concentrations. The cell surface hydrophobicity of *L. acidophilus* La5 significantly increases in proportion to fructose polymer (levan) concentration irrespective of total environmental osmolality.
4. An inverse linear relationship was approved between the cell surface hydrophobicity of ethanologenic and probiotic bacteria and the survival of cells after cryoconservation and storage, as well as under adverse (mineral acid, bile acids, ethanol) environmental conditions. At low external pH, as well as at presence of bile acids, the resistance of probiotic lactic acid bacteria *L. acidophilus* La5 is higher than of *B. lactis* Bb12.
5. Cultivation conditions that ensure the cell surface hydrophobicity at the range of 15% - 25% for ethanologenic (*Z. mobilis* 113S) and 35% – 50% and probiotic bacteria (*L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12), promote improved survival of the cells under adverse environmental conditions.
6. A direct linear relationship was approved between the probiotic culture *L. acidophilus* La5 cell surface hydrophobicity and the proteolytic enzyme activity, whereas *Z. mobilis* 113S levansucrase secretion in the medium decreased with an increase of cell surface hydrophobicity.
7. Assessment of the biochemical composition (proteins/lipids/carbohydrates) of ethanologenic and probiotic bacteria cell envelopes confirmed that changes of the cell surface hydrophobicity of Gram-negative bacteria are indicated by the absorption band position and intensity changes in specific regions of FT-IR spectra, assigned to lipids and carbohydrates, while for Gram-positive bacteria also protein and ester band characteristics are significant.

THESES FOR DEFENCE

1. Cultivation conditions (carbon sources and their concentrations, temperature, growth phase, presence of oxygen and amphiphilic compounds) directly allow to affect the surface properties (cell surface hydrophobicity, membrane permeability, adhesion of the cells) of ethanologenic (*Z. mobilis* 113S) and probiotic bacteria (*L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12).
2. The physiological resistance under adverse environmental factors (freezing/thawing; freeze-drying/rehydration; cryoconservation; presence of mineral and bile acids) of ethanologenic (*Z. mobilis* 113S) and probiotic bacteria (*L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12) is inversely proportional to the values of cell surface hydrophobicity.
3. The secretion of hydrolytic enzymes in the medium by ethanologenic and probiotic bacteria is correlatively related to the cell surface hydrophobicity. The proteolytic enzyme activity of *L. acidophilus* La5 increases, but the levansucrase secretion in the medium by *Z. mobilis* 113S decreases with the increase of the cell surface hydrophobicity.
4. Changes of the cell surface hydrophobicity of ethanologenic (*Z. mobilis* 113S) and probiotic bacteria (*L. acidophilus* La5 and *B. lactis* Bb12) are linked to the biochemical composition (proteins/lipids/carbohydrates) of cell envelopes and could be monitored by variations of appropriate FT-IR spectra absorption band wavenumber and intensity values. Changes of the cell surface hydrophobicity of Gram-negative bacteria are reflected by the absorption band position and intensity variations in lipid and carbohydrate-specific region, but for Gram-positive bacteria the protein and ester band characteristics are also essential.

LITERATŪRA/REFERENCES

1. Al-Tahhan R. A., Sandrin T. R., Bodour A. A. & Maier R. M. (2000) Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Environ Microbiol*, 66: 3262-3268.
2. Alvarez J., Harris P. I., Lee D. C. & Chapman D. (1987) Conformational changes in concanavalin A associated with demetallization and α -methylmannose binding studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 916: 5-12.
3. de Angelis M. & Gobbetti M. (2004) Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomics*, 4: 106-122.
4. Aono R. & Kobayashi H. (1997) Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Appl Environ Microbiol*, 63: 3637-3642.
5. Bâati L., Fabre-Gea C., Auriol D. & Blanc P. J. (2000) Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *Int J Food Microbiol*, 59: 241-247.
6. Bartlett G. R. (1972) General methods of analysis. In Kates M. (ed) *Techniques of lipidology isolation, analysis and identification of lipids*. American Elsevier Publishing Co, New York, pp. 78-80.
7. Batischev O. V. & Indenbom A. V. (2004) Formation of bilayer lipid membranes at apertures in hydrophobized glasses. *Biol Membr*, 21: 415-419.
8. Benschoter A. S. & Ingram L. O. (1986) Thermal tolerance of *Zymomonas mobilis*: temperature-induced changes in membrane composition. *Appl Environ Microbiol*, 51: 1278-1284.
9. Blyholder G., Adhikar C. & Proctor A. (1995) Structure and orientation of oleic acid absorbed onto silica gel. Congrès Infrared studies of surface and adsorbed species. *ACS meeting N°208, Washington DC*, 105(1): pp. 151-158.
10. Bosch A., Serra D., Prieto C., Schmitt J., Naumann D. & Yantorno O. (2006) Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy *Appl Microbial Cell Physiol*, 71: 736-747.
11. Boulbitch A., Quinn B. & Pink D. (2000) Elasticity of the rod-shaped gram-negative eubacteria. *Phys Rev Lett*, 85: 5246-5249.
12. Briandet R., Metlheuc T., Maher C. & Bellon-Fontaine M. N. (1999) *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics environmental growth conditions. *Appl Environ Microbiol*, 65: 5328-5333.
13. Busscher H. J., Bos R., Van der Mei H. C. & Handley P. S. (2000) Physicochemistry of microbial adhesion from an overall approach to the limits. In Baszkin A. (ed) *Physical Chemistry of Biological Interfaces*, New York, Basel: Marcel Dekker, pp. 431-458.
14. Carvalho A. S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F. X. & Gibbs P. (2004) Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Biotechnol Prog*, 20: 248-254.
15. Corveleyn S., Dhaese P., Neirynck S. & Steidler L. (2012) Cryoprotectants for freeze drying of lactic acid bacteria. Pat. US 2012/0039853 A1.
16. Das S. C. & Kapoor K. N. (2004) Effect of growth medium on hydrophobicity of *Staphylococcus epidermidis*. *Indian J Med Res*, pp. 107-109.

17. Decca R. S., López D., Fischbach E., Klimchitskaya G. L., Krause D. E. & Mostepanenko V. M. (2007) Novel constraints on light elementary particles and extra-dimensional physics from the Casimir effect. *Eur J Phys*, 51(4): 963-975.
18. Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E. & Hols P. (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Ant van Leeuwenhoek*, 76: 159-184.
19. Doelle H. W., Kirk L., Crittenden R., Toh H. & Doelle M. B. (1993) *Zymomonas mobilis* - science and industrial application. *Crit Rev Biotechnol*, 13: 57-98.
20. Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E. & Hols P. (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Ant van Leeuwenhoek*, 76: 159-184.
21. Denich T. J., Beaudette H. L., Lee H. & Trevors J. T. (2003) Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J Microbiol Meth*, 52: 149-182.
22. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. & Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Devision Biochem Anal Chem*, 28(3): 350-356.
23. Dyé F. & Delmotte F. M. (1997) Purification of a protein from *Agrobacterium tumefaciens* strain A348 that binds phenolic compounds. *Biochem J*, 321: 319-324.
24. Elias A. W., Chapman D. & Ewing D. F. (1976) Phospholipid penase transitions, effect of n-alcohols, n-monocarboxylic acids, phenylalkyl alcohols and quaternary ammonium compounds. *Biochem Biophys Acta*, 448: 220-230.
25. Fries E. (1977) Studies on the interaction of detergents with membranes and membrane proteins. *Appala*, 6-17.
26. Geertsema-Doornbusch G. I., van der Mei H. C. & Busscher H. J. (1993) Microbial cell surface hydrophobicity. The involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH). *J Microbiol Meth*, 18: 61-68.
27. Gobetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F. & Addeo F. (2000) Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis ssp. cremoris* FT4. *Appl Environ Microbiol*, 66(9): 3898-3904.
28. Grube M., Gapes J. R. & Schuster K. C. (2002) Application of quantitative IR spectral analysis of bacterial cells to acetone–butanol–ethanol fermentation monitoring. *Anal Chim Acta*, 471: 127-133.
29. Grube M., Rutkis R., Gavare M., Lasa Z., Strazdina I., Galinina N. & Kalnenieks U. (2012) Application of FT-IR spectroscopy for fingerprinting of *Zymomonas mobilis* respiratory mutants, *Spectrosc*, 27(5-6): 581-585.
30. Guarner F. & Schaafsma G. J. (1998) Probiotics. *Int J Food Microbiol*, 39(3): 237-8.
31. Gunasekaran P. & Chandra Raj K. (1999) Ethanol fermentation technology – *Zymomonas mobilis*. *Current Sci India*, 77(1): 56-68
32. van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S. D. & Maguin E. (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Ant van Leeuwenhoek*, 82: 187-216.
33. Hammarström S., Carlsson H. E., Perlmann P. & Svensson S. (1971) Immunochemistry of the common antigen of enterobacteriaceae (kunitz) relation to lipopolysaccharide core structure. *J Experimental Med*, 134(3): 565-576.
34. Harrigan G. G., LaPlante R. H., Cosma G. N., Cockerell G., Goodacre R., Maddox J. F., Ludyenck J. P., Ganey P. E. & Roth R. A. (2004) Application of high-throughput Fourier-transform infrared spectroscopy in toxicology studies: contribution to a study on the development of an animal model for idiosyncratic toxicity. *Toxicol Lett*, 146: 197-205.

35. Heller K. J. (2001) Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristic and starter organisms. *Am J Clin Nutr*, 73: 374S-379S.
36. Huang W. E., Hopper D., Goodacre R., Beckmann M., Singer A., Draper J. (2006) Rapid characterization of microbial biodegradation pathways by FT-IR spectroscopy. *J Microbiol Meth*, 67: 273-280.
37. Ikawa M. & Snell E. E. (1960) Cell wall composition of lactic acid bacteria. *J Bacteriol Chem*, 235: 1376-1382.
38. Kabadjova-Hristova P., Bakalova S., Gocheva B. & Moncheva P. (2006) Evidence for proteolytic activity of *lactobacilli* isolated from kefir grains. *Biotechnol Biotechnological Equipment*, 20: 89-94
39. Karimi Torshizi M. A., Rahimi Sh., Mojgani N., Esmaeilkhani S. & Grimes J. L. (2008) Screening of indigenous strains of lactic acid bacteria for development of a probiotic for poultry. *Asian-Austral J Animal Sci*, 21: 1495-1500.
40. Kilimann K. V., Hartmann C., Delgado A., Vogel R. F. & Ganzle M. G. (2006) Combined high pressure and temperature induced lethal and sublethal injury of *Lactococcus lactis* - Application of multivariate statistical analysis. *Int J Food Microbiol*, 109(1-2): 25-33.
41. Kimoto-Nira H., Suzuki C., Sasaki K., Kobayashi M. & Mizumachi K. (2010) Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. *Int J Food Microbiol*, 143: 226-229.
42. Kos B., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J. & Matošić S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol*, 94: 981-987.
43. Kumar M., Dhillon S., Singhal A., Sood A., Ghosh M. & Ganguli A. (2011) Cell surface and stress tolerance properties of a newly isolated *Lactobacillus plantarum* CH1. *Acta Alimentaria*, 40: 38-44.
44. Kunitz M. (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *J Gen Physiol*, 30: 291-310.
45. Lieve L. (1974) The barrier function of the Gram-negative envelope. *Ann NY Acad Sci*, 235: 109-127.
46. Lindahl M., Faris A., Wadström T. & Hjertén S. (1981) A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochem Biophys Acta*, 677: 471-476.
47. Ljungh Å. & Wadström T. (2006) Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Iss Intest Microbiol*, 7: 73-90.
48. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
49. Madigan M. T., Martinko J. & Parker J. (2002) Brock Biology of Microorganisms (10th edition). Upper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall, Pearson education, Inc., 1104 p.
50. Majidzadeh Heravi R., Kermanshahi H., Sankian M., Nassiri M. R., Heravi Moussavi A., Roozbeh Nasirali L. & Varasteh A. R. (2011) Screening of *lactobacilli* bacteria isolated from gastrointestinal tract of broiler chickens for their use as probiotics. *Afr J Microbiol Res*, 5: 1858-1868.
51. de Man J. C., Rogosa M. & Sharpe M. E. (1960) A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J Appl Bacteriol*, 23: 130-135.
52. Marshall K. C. (1976) Interfaces in Microbial Ecology. *Harvard University Press, Cambridge, MA*.
53. Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R. & Saarela M. (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J*, 12: 173-182.
54. Mazarevica G., Diewok J., Baena J. R., Rosenberg E. & Lendl B. (2004) On-line fermentation monitoring by mid-infrared spectroscopy. *Appl Spectrosc*, 58(7): 804-810.

55. McEldowney Sh. & Fletcher M. (1986) Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appl Environ Microbiol*, 52: 460-465.
56. Montenecourt B. S. (1985) *Zymomonas*, a unique genus of bacteria. Biology of industrial microorganisms. *California: The Benjamin/Cummings publishing company*, pp. 261-289.
57. Morris D. L. (1948) Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Sci*, 107: 254-255.
58. Naumann D. (2000) Infrared spectroscopy in microbiology. In Meyers R. A. (ed.) Encyclopedia of analytical chemistry. Wiley, Chichester, pp. 102-131.
59. Nichols P. D., Smith G. A., Antworth C. P., Hanson R. S. & White D. C. (1985) Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxy fatty acids as potential signatures for methane-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*, 31: 327-335.
60. Nikaido H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67: 593-656.
61. Nikaido H. & Vaara M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev*, 49: 1-32.
62. Nikovskaya G. N., Gordiyenko A. S. & Globa L. I. (1989) The hydrophilic and hydrophobic properties of microorganisms under different conditions of cultivation. *J Microbiol*, 58: 448-451.
63. Olejnik A., Lewandowska M., Obarska M. & Grajek W. (2005) Tolerance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains to low pH, bile salts and digestive enzymes. *Electronic J Polish Agricultural University* 8, #5
64. Osborn M. J., Gander J. E., Parisi E. & Carson J. (1972) Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J Biol Chem*, 247(12): 3962-3972.
65. Ouwehand A. C., Suomalainen T., Tolkko S. & Salminen S. (2002) In vitro adhesion of propionic acid bacteria to human intestinal mucus. *Lait*. 82: 123-130.
66. Pérez P. F., Minnaard Y., Disalvo E. A. & de Antoni G. L. (1998) Surface properties of Bifidobacterial strains of human origin. *Appl Environ Microbiol*, 64: 21-26.
67. Piater L. A. (2005) Identification and characterization of mutagen activated protein kinases in leaf tissue of *Nicotinia tabacum* in response to elicitation by lipopolysaccharides. *South Africa: Johannesburg; Ph.D. thesis*.
68. Pistorius A. M., DeGrip W. J. & Egorova-Zachernyuk T. A. (2009) Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy. *Biotechnol Bioeng*, 103: 123-129.
69. de los Reyes-Gavilán C. G., Ruas-Madiedo P., Noriega L., Cuevas I., Sánchez B. & Margolles A. (2005) Effect of acquired resistance to bile salts on enzymatic activities involved in the utilisation of carbohydrates by bifidobacteria. An overview. *Le Lait Dairy Sci Technol*, 85: 113-123.
70. Rosenberg M. & Doyle R. J. (1990) Microbial cell surface hydrophobicity: history, measurement, and significance. In: Doyle R. J. & Rosenberg M. (eds.) Microbial cell surface hydrophobicity. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 1-37.
71. Rosenberg M., Gutnick D. & Rosenberg E. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett*, 9: 29-33.

72. Sato K., Goto M., Yano J., Honda K., Kodali D. R. & Small D. M. (2001) Atomic resolution structure analysis of β' polymorph crystal of a triacylglycerol: 1,2-dipalmitoyl-3-myristoyl-sn-glycerol. *J Lipid Res*, 42: 338-345.
73. Savage D. C. & Fletcher M. (1985) Bacterial adhesion: mechanisms and physiological significance. *Plenum Press, New York*, pp. 111-129.
74. Schar-Zammaretti P. & Ubbink J. (2003) The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophys J*, 85: 4076-4092.
75. Schar-Zammaretti P., Dillmann M. L., D'Amico N., Affolter M. & Ubbink J. (2005) Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environment Microbiol*, 71: 65-73.
76. Segura A., Duque E., Mosqueda G., Ramos J. L. & Junker F. (1999) Multiple responses of Gram-negative bacteria to organic solvents. *Environ Microbiol*, 1: 191-198.
77. Semjonovs P., Jasko J., Auzina L. & Zikmanis P. (2008) The use of exopolysaccharide-producing cultures of lactic acid bacteria to improve the functional value of fermented foods. *J Food Technol*, 6: 101-109.
78. Severcan F. & Harris P. I. (2012) Vibrational spectroscopy in diagnosis and screening. *IOS Press*, p. 421.
79. Shakirova L., Auzina L., Grube M. & Zikmanis P. (2008) Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of bacteria *Zymomonas mobilis* after exposures to ethanol, freezing or freeze-drying. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35: 1175-1180.
80. Shakirova L., Auzina L., Zikmanis P., Gavare M. & Grube M. (2010) Influence of growth conditions on hydrophobicity of *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cells and characteristics of FT-IR spectra. – *Spectrosc*, 24: 251-255; DOI 10.3233/ SPE-2010-0470.
81. Shakirova L., Grube M., Goodacre R., Gavare M., Auzina L. & Zikmanis P. (2013) FT-IR spectroscopic investigation of bacterial cell envelopes from *Zymomonas mobilis* which have different surface hydrophobicities. *Vibrat Spectrosc*, 64: 51-57; DOI: 10.1016/j.vibspec. 2012.10.008
82. Shakirova L., Grube M., Gavare M., Auzina L. & Zikmanis P. (2013) Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 and characteristics of FT-IR spectra. – *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, 40: 85-93; DOI: 10.1007/s10295-012-1204-z.
83. Shalini J. & Hariom Y. (2009) Probiotic attributes of lactic acid bacteria isolates. Protocol Online <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/Probiotic-Attributes-of-Lactic-Acid-Bacteria-Isolates-3463.html>
84. Sikkema J., de Bont J. A. M. & Poolman B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev*, 59: 201-222.
85. Sweet S. P., MacFarlane T. W. & Samaranayake L. P. (1987) Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method. *FEMS Microbiol Lett*, 48: 159-163.
86. Talwalkar A. & Kailasapathy K. (2004) The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Curr Issues Intest Microbiol*, 5: 1-8.
87. Tannock G. W. (2002) Probiotics and Prebiotics: Where Are We Going? *Caister Academic Press, Wymondham, UK*, ISBN 0-9542464-1-1. 333 pp.
88. Tornabene T. G., Holzer G., Bittner A. S. & Grohmann K. (1982) Characterization of the total extractable lipids of *Zymomonas mobilis* var. *mobilis*. *Can J Microbiol*, 28: 1107-1118.

89. Träuble H. & Overath P. (1973) The structure of *Escherichia coli* membranes studied by fluorescence measurements of lipid phase transitions. *Biochim Biophys Acta*, 307: 491-512.
90. Tsuchido T., Aoki I. & Takano M. (1989) Interaction of the fluorescent dye 1-*N*-phenyl-naphthylamine with *Escherichia coli* cells during heat stress and recovery from heat stress. *J Gen Microbiol*, 135: 1941-1947.
91. Vanhaecke E., Remon J.-P., Moors M., Raes F., de Rudder D. & van Peteghem A. (1990) Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol*, 56: 788-795.
92. Vinderola C. G., Mocchiutti P. & Reinheimer J. A. (2002) Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J Dairy Sci*, 85: 721-729.
93. Wadström T. (1990) Hydrophobic characteristics of *Staphylococci*: role of surface structures and role in adhesion and host colonization. In Doyle R. J. & Rosenberg M. (eds) Microbial Cell Surface Hydrophobicity. *American Society for Microbiology, Washington, D.C.*
94. Wang H., Hollywood K., Jarvis R. M., Lloyd J. R. & Goodacre R. (2010) Phenotypic characterization of *Shewanella oneidensis* MR-1 under aerobic and anaerobic growth conditions by using Fourier transform infrared spectroscopy and high-performance liquid chromatography analyses. *Appl Environ Microbiol*, 76: 6266-6276.
95. Webster L. T. (1925) The acid agglutination of mixtures of oppositely charged bacterial cells. *J Gen Physiol*, 7: 513-515.
96. Westphal O., Lüderitz O. & Bister F. (1952) Über die Extraction von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z Naturforsch*, 7b: 148-155.
97. Wood J. M. (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63: 230-262.
98. Zikmanis P., Shakirova L., Baltkalne M., Andersone I. & Auzina L. (2005) The effect of amphiphilic compounds on the secretion of levansucrase by *Zymomonas mobilis*. *Proc Biochem*, 40: 3723-3731.
99. Zikmanis P., Shakirova L., Auzina L. & Andersone I. (2007) Hydrophobicity of bacteria *Zymomonas mobilis* under varied environmental conditions. *Proc Biochem*, 42: 745-750.